

ESTERILIZACION (Preparación de Bioindicadores para esterilización)

María Eugenia Delgado Picado M.Q.C.* Claudia Hidalgo Quesada M.Q.C.** Carmen Ma. Fernández Montoya M.Q.C.***

INTRODUCCION

El término de ESTERILIZACION (6), (7) se define en general como el proceso por el cual se elimina toda forma de vida, por lo tanto en un producto estéril debe garantizarse la ausencia total de organismos viables, independientemente de que sean bacterias, hongos o virus y del método por el que se realizó la esterilización. Puesto que hay diferentes formas de esterilizar basadas en métodos físicos (calor húmedo, seco, radiaciones ionizantes, filtración, etc.) o tratamiento con agentes químicos (óxido de etileno, formaldehído, etc.), el que se realiza mediante el calor por vapor bajo presión es el más práctico y el más accesible en nuestro medio. (4), (7). Dado que la esterilización es de práctica rutinaria en los campos de Microbiología, Medicina, Farmacia e Industrias, es indispensable que este proceso sea llevado a cabo por personal bien entrenado y que además sea controlado y comprobada la efectividad del proceso. Uno de los métodos más efectivos para realizar controles adecuados es el empleo de preparados biológicos conocidos como indicadores biológicos (2), (5). Estos controles pueden conseguirse comercialmente y también pueden ser preparados en un laboratorio bacteriológico siguiendo un procedimiento como el que se describirá más adelante.

MATERIALES Y METODO.

Ampollas comerciales: Se usaron ampollas marca Proof de la casa Amisco que contienen cada una un disco impregnado de esporas de *Bacillus subtilis* var. *globigil*. Dentro de estas ampollas viene también el medio de cultivo requerido para la germinación de las esporas. (1), (3). **Papel de filtro:** las cuadrillos que se impregnaron de esporas fueron cortados de papel de filtro. **Botellas de Roux:** Llevan un medio apropiado para la formación de espóra que consiste de agar nutritivo más 0.01% de sulfato de manganeso. (8). **Placas de petri plásticas:** Contienen en su interior agar nutritivo. **Tubos estériles:** Contienen en su interior caldo tripticase soya. **Otros artículos:** Una cámara de incubación a 37°C, un horno, un baño maría a 80°C, una micropipeta automática, refrigerador, portaobjetos, microscopio, juego de colorantes para la tinción de gram. **Otros artículos estériles:** Entre ellos se encuentran perlas de vidrio, pipetas de 10 ml., tubos de rosca, agua destilada o solución salina.

Procedimiento para la preparación de Bioindicadores Biológicos.

1— Preparar los cuadros del papel de filtro que serán impregnados posteriormente con esporas. En este caso se cortaron cuadrillos de un cm. por un cm. de lado, éstos se guardan en frascos de vidrio con tapón de rosca para ser llevados a esterilizar posteriormente. 2— Colocar uno o más discos comerciales de esporas de *B. subtilis* var. *globigil* a germinar en caldos tripticase-soya a 37°C. Comprobar por tinción de gram la cantidad de formas vegetativas a las 24 horas. (4). Si no hay gran predominio de bacilos sobre las esporas se incuba por más tiempo. 3— Preparar las botellas de Roux con el medio apropiado para la formación de esporas (8) y a partir del caldo de germinación inocular 1 ml del crecimiento en la botella de Roux e incubar a 37°C. Dejar por 5 a 7 días para lograr el máximo de esporulación. 4— Hacer tinción de gram y cuando hay aproximadamente un 90% de formas esporuladas, se procede a extraer el crecimiento de la botella lavando el mismo con una pequeña cantidad de solución salina o agua destilada estéril. Además se introducen en la botella unas perlas de vidrio estériles para homogenizar la suspensión de esporas e impedir que se formen grumos. Posteriormente se extraen 10 ml. y se introducen en un tubo de rosca estéril. 5— Como no se conoce la concentración real de la suspensión, se calcula que está entre 10^{10} y 10^{12} esporas por mililitro (8) y a partir de ese cálculo se hacen diluciones seriadas: primero una dilución 1:100 de la suspensión madre, usando agua estéril. Esa primera dilución se calienta en baño maría a 80°C por 5 minutos para destruir las formas vegetativas que existieran (6), (8). Enfriar y a partir de ella montar diluciones seriadas hasta calcular una concentración de 1 por ml. 6— Sembrar por vaciado (4), (7), empleando como medio agar nutritivo, en este punto se escogen las diluciones que se supone darán una concentración de 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , y 10 esporas por ml. 7— Incubar los platos a 37°C por 48 horas y al cabo de ese tiempo hacer conteo de colonias, luego se estandariza la suspensión y la cantidad de esporas que va a ser inoculadas en los cuadros de papel de filtro. En nuestro experimento obtuvimos una concentración en el cultivo madre de 8.3×10^9 esporas por ml. 8— Escoger la cantidad de espóra que tendrá cada cuadro control. En este caso elegimos una cantidad del orden de 10^5 por cuadrillo (5), para lo cual se diluyó la suspensión madre 1:100 y luego 1:2 quedando una concentración final de 4.15×10^7 espóra por ml. Como a cada cuadro se le colocó una gota de 0.02 ml. (equivalente a una dilución de 1:50)² la cantidad final de esporas en el trozo de papel fue de 8.3×10^5 , que es lo que corrientemente traen los controles

* Laboratorio de la Clínica de Siquirres.

** Laboratorio de la Clínica de San Rafael de Puntarenas.

*** Laboratorio del Hospital Tony Facio de Limón.

comerciales (5). 9— Con pipeta automática que de 0.02 ml., se inoculan todos los cuadrillos previamente esterilizados y secados al horno. 10— Secar los cuadrillos a temperatura ambiente por varias horas, posteriormente introducirlos en frascos estériles y conservarlos en refrigeración. 11— Montar un control de viabilidad de los cuadros inoculados, sembrando en caldo tripticase soya. Incubar por 7 días a 37°C. (5), (8).

Esquema de diluciones

10^{10} — 10^{12} ——— límites de concentración inicial
1:100
 10^8 — 10^{10}
diluciones seriadas
 10^9 — 10^8 — 10^7 — 10^6 — 10^5 — 10^4 — 10^3 — 10^2 — 10^1 — 10^0 esporas
sembrar 0.1 ml (1:10) de las siguientes concentraciones.
 10^6 — 10^5 — 10^4 — 10^3 — 10^2 — 10^1 — 10^0 esporas/ml.
incubar a 37°C por 48 horas
83 colonias ——— 10^5

Cálculo de la concentración inicial real de esporas/ml:

$$\text{Dilución} = \frac{\text{Concentración final}}{\text{Concentración inicial}} = \frac{D \times C_f}{C_i}$$

$$\text{factor de dilución} = 10^5 \times 10^2 \times 10^1 = 10^8$$

$$\text{dilución} = 10^8$$

$$\text{conteo de colonias} = 83$$

$$10^8 = \frac{83}{C_i}$$

$$C_i = 8.3 \times 10^9 \text{ esporas/ml.}$$

Cálculo de la concentración de esporas por cuadro:

$$8.3 \times 10^9 \quad 1:1008.3 \times 10$$

$$8.3 \times 10^9 \quad 1:2$$

$$4.15 \times 10^7 \quad 1:50$$

$$8.3 \times 10^5 \text{ esporas/cuadro.}$$

Discusión

Los test de esterilización son el único camino que nos dice si el esterilizador está trabajando bien, o si la carga está estéril. Hay controles mecánicos que vienen a actuar como indicadores físicos, forman parte del equipo y nos ayudan pero no dan un parámetro exacto de esterilización, por ej.: encontramos termómetro, manómetros, cronómetros, etc. Los aparatos usan dos tipos de indicadores: Químicos y Biológicos.

Indicadores Químicos: Son discos de papel impregnados con sustancias químicas que cambian de color ante el agente esterilizante. Una de las grandes desventajas del indicador químico es el que solo nos indica una condición presente: la esterilización implica cierta concentración del agente, humedad, temperatura, y tiempo, si varía una de esas condiciones, el indicador falla y se vuelve inexacto aunque las demás condiciones estén funcionando bien, por lo tanto este tipo de indicado solo nos dice que el aparato se expuso a las condiciones óptimas de trabajo y se controla mediante cambios de color del papel. (2), (5).

Indicar Biológico: Se puede llevar a cabo de varias formas: 1— Por un método directo que implica colocar muestras a cultivar en un medio líquido como caldo de tioglicolato, de saboureaud, etc., posteriormente se esterilizan y luego se cultivan nuevamente en los medios apropiados según el microorganismo; la ausencia de crecimiento implicaría esterilidad, sin embargo este método es inadecuado en la práctica porque los materiales son irregulares en forma y tamaño e inconvenientes de manipular. 2— Control Biológico: es el método de control de esterilidad más correcto. Se basa en el uso de microorganismos vivos que se someten a las mismas condiciones del medio requeridas para su destrucción. Los microorganismos se depositan sobre un substrato acarreador y son el único indicador confiable de ser susceptible o verse afectado por variables de concentración, temperatura, humedad y tiempo. Los papeles se impregnan con bacterias o esporas con una población conocida, se colocan dentro de los paquetes antes de llevarlos a esterilizar, posteriormente se remueven asépticamente (4) y se transfieren a un medio de incubación adecuado según el microorganismo empleado y si no crecen en un período de 7 días, el material se considera estéril. (5), (8). El control biológico en cuanto a su preparación requiere de cuidadoso control sobre la selección del microorganismo, medio de crecimiento y población empleada, por ej: se puede usar *Bacillus subtilis* var. *globigil*, *Bacillus cereus*, *Bacillus stercorophilus*, *Escherichia coli*, etc. Se recomienda usar esporas de *B. subtilis* por su fácil manejo, es una de las más resistentes que existen, crecen rápidamente sobre medios ordinarios y pueden ser fácilmente indetectables por el pigmento anaranjado cuando crecen sobre superficies de agar sólido. (5). La población de células o esporas debe relacionarse estrechamente con el probable nivel de contaminación de los artículos, la contaminación "normal" de artículos limpios y cuartos secos anda entre unos cientos hasta veinticinco mil bacterias. (5), (7). Sobre esta base el control biológico debe contener una población alta de microorganismos proveyendo un factor de seguridad, se recomienda una población entre 10^5 y 10^6 esporas viables (5). Los materiales utilizados en la preparación de los Bioindicadores son accesibles para la mayoría de los laboratorios bacteriológicos quienes pueden hacer realidad el uso de los mismos.

Resumen.

Los indicadores químicos usados como control de esterilización son uno de los métodos más frecuentemente usados en nuestros laboratorios sin embargo éste es un método inexacto puesto que un cambio de color en la tira del control químico es la única prueba de esterilidad; en realidad solo está hecho para cambiar de color ante la presencia del agente esterilizante sin tomar en cuenta otros factores importantes como son humedad, concentración del agente, temperatura y tiempo. Para garantizar la verdadera efectividad de la esterilización, se describe un método para la preparación de Bioindicadores a base de microorganismos viables (esporas) que toma en cuenta todas las variables anteriores y que nos indica realmente si el esterilizador está trabajando bien o si la carga está estéril.

Bibliografía

- 1— Beeby, M.M., and Whitehouse, C.E. *A Bacterial Spore Test Piece for the Control of Ethylene Oxide Sterilization*, *J. Appl. Bacteriol.* 28 (3): 349-60, 1965.
- 2— Brewer, J.H., and Ansberger, R.J. *Biological-Chemical Indicator for Ethylene Oxide Sterilization*, *J. Pharma. Sci.* 55 (1): 57-59. 1966.
- 3— Chen, J.H.S., Ortenzio, L.F. and Stuart, L.S. *Application of A.O.A.C. Sporicidal test to Evaluating Efficiency of Sterilizing Devices and Sporicidal* *Chemical, Bacteriol. Proc.* 67th, Annual Meeting, Am. Soc. Microbiol., p: 13. 1967.
- 4— Fernández B, Brunker T, Ryan K.A. *Manual de Laboratorio, Universidad de Costa Rica.* pag: 38, 77-81. 1978.
- 5— Kereluk K.D, Lloyd R.S. *Sterilization indicators and Biological Control in Kereluk K.D. Ethylene Oxide Sterilization, 3a, edition, published at Erie, Pennsylvania, U.S.A.* 1 (7): 39-59.
- 6— Mc. Culloch, E.C. *Desinfection and Sterilization, Philadelphia, Lea and Febiger,* p: 325-7. 1945.
- 7— Pelcsar, Reid and Chan. *Microbiology, 4a Edition, Mc Graw-Hill Book Company.* p: 135-147, 413-23. 1977.
- 8— Perkins, J.J. *Principles and Methods of sterilization in Health Sciences.* Ed. Charles C. Thomas, p: 494-7. 1980.