

INFORMACIÓN GENERAL SOBRE INDICADORES BIOLÓGICOS

Autor: Raben Biological Laboratorios

1. ¿Cuál es la finalidad de un indicador biológico?

Un indicador biológico es utilizado para monitorear y validar ciclos de esterilización.

2. ¿Por qué existen diferentes especies de esporas para diferentes tipos de esterilización?

La pregunta del usuario acerca de si un ítem particular ha sido esterilizado, se vincula con el hecho de saber si su ciclo de esterilización puede matar algo conocido por ser muy resistente al ciclo específico que corre el usuario. En este sentido, el *Geobacillus stearothermophilus* ha demostrado ser muy resistente a ciclos de vapor a 121°C y a ciertos vapores químicos. Por lo tanto, este bacilo es la mejor opción como especie para ser usada en indicadores para procesos por vapor. Por otra parte, el *Bacillus subtilis* ha demostrado ser el más resistente a ciclos por calor seco y óxido de etileno, y el *Bacillus pumilus*, el más resistente a la radiación gamma.

3. ¿Qué es el Valor "D"?

El Valor "D" significa Valor de Reducción Decimal (ó tiempo de reducción decimal). Es una medida en minutos de la resistencia de las esporas sometidas a las condiciones de esterilización. Más precisamente, es la cantidad de minutos necesarios para matar al 90% de los organismos. También es definido como el tiempo en minutos necesario para lograr una reducción de la población microbiana en un logaritmo.

4. ¿Qué significa lo explicado en el punto de arriba?

Los indicadores biológicos estándar normalmente contienen poblaciones que van de las 100.000 (10.5) a 1.000.000 (10.6) de esporas o colonias formando unidades (CFU) por vial. El Valor "D" da un número que puede ser usado para calcular un tiempo de muerte teórico para el indicador biológico. Simplemente hay que tomar el logaritmo de la población (por ejemplo, $\log_{10} - 2.7 \times 10^{5.5}$ CFU) y multiplicarlo por el Valor "D" (or ejemplo, 1.9 minutos) y se obtendrá la cantidad mínima de tiempo necesaria (a las condiciones apropiadas) para matar todas las esporas del indicador biológico.

La USP (United States Pharmacopeial) modifica la ecuación para dar una ventana de muerte/sobreviva, definiendo "tiempo de sobrevida" y "tiempo de muerte":

- Tiempo de sobrevida (en minutos) = no menos que (Valor "D" señalado en el indicador) X (cálculo del logaritmo de esporas señalado en el indicador -2).

Cuando un indicador biológico es sometido al tiempo determinado por esta ecuación se espera que sobrevivan todas las esporas.

- Tiempo de muerte (en minutos) no menos que (Valor "D" señalado en el indicador) X (cálculo del logaritmo de esporas señalado en el indicador +4)

Cuando un indicador biológico es sometido al tiempo determinado por esta ecuación se espera que mueran todas las esporas.

5. ¿Qué significa que un ítem sea "estéril"?

Significa simplemente que se trata de un ítem ausente de contaminación microbiana. Desafortunadamente, verificar que un ítem esté o no esté "estéril" no es una tarea sencilla. Cuando se procesa una gran cantidad de productos, la toma de muestras posterior a la esterilización no es un método adecuado para detectar bajos niveles de productos "no estériles". Si se procesan 100 ítems, y existiera un nivel de contaminación del 1%, un chequeo de esterilidad (posterior al ciclo de esterilización) con una muestra de 20 ítems dará como resultado un ítem estéril 8 de cada 10 veces.

En lugar de llevar a cabo un chequeo de esterilidad por muestra posterior al ciclo de esterilización, se puede inferir la esterilidad de una carga usando indicadores biológicos. Se sabe que las esporas mueren en forma logarítmica. Esto significa que un porcentaje de esporas muere con cada incremento de tiempo (el 90% de las esporas muere por cada punto de Valor "D" de exposición a las condiciones de esterilización). Como sólo una fracción del total de la población microbiana muere con cada incremento de Valor "D", entonces esto determinaría que sólo un ciclo infinitamente largo sería suficiente para asegurar que todos los ítems se encuentren estériles.

Supongamos un Valor "D" = 1 minuto. De acuerdo a los valores de la tabla de abajo (reproducida de Sterilization Technology), un ciclo de 8 minutos dejaría 10.⁻² o 0.01 esporas sobrevivientes por unidad. Puesto que es imposible tener el 1% de

una espora viva, esto mismo puede ser más apropiadamente dicho de la siguiente manera: de cada 100 indicadores biológicos expuestos durante 8 minutos se puede esperar que sólo uno de ellos muestre vida (se tiene la probabilidad de que sobreviva al proceso de esterilización 1 de cada 100), asumiendo que todas las unidades comenzaron con la misma carga microbiana (en este caso, 1 millón). Ahora que se puede calcular la probabilidad de esporas de sobrevivientes, es necesario determinar qué probabilidad es aceptable para los ciclos que habitualmente corremos. Y esto tiene que ver con el uso de los ítems que van a ser esterilizados.

Esta probabilidad es conocida como Coeficiente de Seguridad de Esterilización (CSE) –en inglés Sterility Assurance Level (SAL)-. Las normas AAMI en su guía de calor húmedo afirman que “se reconoce en las comunidades científicas y farmacéuticas que los procesos de esterilización terminal deberían otorgar una probabilidad de supervivencia no mayor que 10.⁻⁶”. Esto se aplica generalmente a ítems que pueden entrar en contacto con tejidos comprometidos (por ejemplo, implantables, instrumental quirúrgico, etc.).

Tiempo de exposición (en minutos)	Bacterias vivas al comienzo del ciclo	Bacterias muertas en 1 minuto	Bacteria sobrevivientes al final del ciclo	Logaritmo de sobrevivientes (a comienzos del minuto)
1	1.000.000	900.000	100.000	6
2	100.000	90.000	10.000	5
3	10.000	9.000	1.000	4
4	1.000	900	100	3
5	100	90	10	2
6	10	9	1	1
7	1	0.9	0.1	0
8	0.1	0.09	0.01	-1
9	0.01	0.009	0.001	-2
10	0.001	0.0009	0.0001	-3
11	0.0001	0.00009	0.00001	-4
12	0.00001	0.000009	0.000001	-5
13	0.000001	0.0000009	0.0000001	-6

Tabla y ejemplo tomado de **Sterilization Technology**, p 36-38, 1993.

6. Mis indicadores biológicos dieron como resultado crecimiento positivo y los gram tiñeron como el organismo indicado. ¿Qué hago ahora?

Hay varias cosas que se deberían hacer para rastrear las posibles causas de un resultado positivo de crecimiento:

- a) ¿Estuvieron comprometidos los indicadores biológicos en su retirada del esterilizador?

Por ejemplo, ¿el sobre estaba roto (ó la tapa removida) antes de ser transferido en forma aséptica al medio de cultivo? ¿Se llevaron a cabo los procedimientos asépticos para realizar la transferencia? ¿Se verificó la esterilidad del medio de cultivo? ¿Estaban los indicadores biológicos húmedos cuando se retiraron del esterilizador?

b) Se deberían chequear los parámetros establecidos en el esterilizador y revisadas las instrucciones de uso de los indicadores biológicos. Si se tiene un documento con el registro de los parámetros del esterilizador que dio crecimiento positivo, entonces debería ser chequeado si los parámetros fueron mantenidos durante todo el ciclo. Revisar las instrucciones del fabricante para verificar que los indicadores biológicos estén siendo correctamente manejados y guardados.

c) Verificar inmediatamente el esterilizador y seguir las instrucciones del protocolo de la Institución o del Servicio para manejar casos de ciclos fallidos.

d) Verificar el Certificado de Desempeño (Certificate of Performance) que viene con los indicadores biológicos. Revisar en las instrucciones si se tiene una carga bacteriana o un Valor "D" mayores a los habituales. Si se tienen ambos valores sensiblemente por encima de los valores habitualmente utilizados en los indicadores biológicos, entonces con seguridad esta será una posible causa de crecimiento de los indicadores. Hay que verificar el Tiempo de Muerte (Kill time) multiplicando (Valor "D") X (log 10 de la población + 4). Esto dará como resultado un Coeficiente de Seguridad de Esterilización de 10.-4, pero los ciclos deben superar este valor obtenido (asumiendo que los ciclos de esterilización fueron diseñados para dar un Coeficiente de Seguridad de Esterilización de 10.-6 en el momento de su validación). Si el ciclo no fue diseñado para matar un indicador biológico con una alta población de esporas y un alto Valor "D", entonces se debería buscar un indicador biológico comparable con aquel que fuera usado para validar el esterilizador o revalidar nuevamente el esterilizador con un indicador biológico más resistente o un Coeficiente de Seguridad de Esterilización más bajo.

e) Revisar cómo fue cargado el esterilizador y cómo fue colocado el indicador biológico. ¿El indicador biológico estaba ubicado cerca del drenaje? Esta es normalmente la parte más fría de un esterilizador por vapor y la de más difícil acceso al agente esterilizante. ¿Estaba la cámara vacía? Una cámara vacía necesita más agente esterilizante (vapor o vapor químico) que una cámara llena de ítems ocupando espacio. Si se cree que ambos se corresponden con la experiencia

personal entonces debe llamarse al servicio de reparación del equipo o rediseñar los parámetros del ciclo de modo que el nuevo ciclo pueda matar todo aún en una cámara vacía o cerca del drenaje. ¿El indicador biológico estaba colocado en una cacerola, en un vial sellado o con tapa, dentro de un envase o en una zona que pudiera evitar un contacto suficiente con el agente esterilizante? Para ciclos por vapor o en equipos Chemiclave®, las cacerolas o bandejas deben tener agujeros en la base de modo que el aire más frío o el vapor puedan atravesar y salir por el drenaje. Las cacerolas sin agujeros (puesto que el calor se eleva y el aire frío desciende) tienden a juntar el aire frío. Un vial sellado o una bolsa hermética pueden disminuir enormemente la capacidad de transferencia del calor debido al aire seco que hay dentro de ellos. El aire es un conductor de calor más pobre en comparación con el agua o el vapor. Si esto estuviera sucediendo en el propio esterilizador, entonces habrá que asegurarse que los envases contenedores tengan acceso a la fuente de vapor.

7. Mis indicadores biológicos no muestran resultados de acuerdo a lo indicado en la etiqueta del producto. ¿Por qué?

En algunas ocasiones algunos usuarios pueden encontrar que sus indicadores biológicos no se comportan de acuerdo a lo indicado en las instrucciones del producto. Aquí mencionamos algunas cosas para prestar atención cuando esto suceda:

a) Temperatura de incubación: los *Bacillus subtilis* y los *Bacillus pumilus* son microorganismos mesófilos y crecen mejor en temperaturas alrededor de los 35°C (95°F). Los *Geobacillus stearothermophilus* son un microorganismo termófilo y crece bien entre temperaturas de 40°C y 70°C, pero lo ideal es incubarlos cerca de los 56°C.

b) Condiciones de guardado: algunos fabricantes recomiendan la refrigeración, otros están en contra de esta. Un guardado incorrecto puede afectar en gran manera el posterior desempeño de los indicadores biológicos. Hay que recordar que los fabricantes validó las condiciones de guardado para sus propios indicadores biológicos, señalando las condiciones válidas para la vida estante de su producto. Se debe estar seguro de seguir las recomendaciones del fabricante para el guardado de su producto específico.

c) Medio de cultivo: el medio de cultivo recomendado es la soja tríptica. Diferentes marcas pueden variar en su habilidad para promover el crecimiento (cuando se

comparan diferentes marcas algunas veces las diferencias son tan grandes como todo un punto Log de Colonias Formando Unidades). Es recomendable utilizar medios de cultivo frescos. El Agar recalentado disminuye mucho su capacidad de promover el crecimiento de las esporas.

d) Metodología del test: especialmente si se está tratando de verificar la población o el Valor "D", es imperativo que se siga el mismo procedimiento que el realizado por el fabricante (USP XXII, p.170).

8) ¿Puedo utilizar indicadores biológicos del tipo Prospore (ampolla de vidrio) para monitorear solamente líquidos, o puedo ubicarlo en la cámara y utilizarlo como haría con una tira de esporas?

Prospore es testeado en la misma manera que una tira de esporas o un indicador Prospore 2. Se determina un Valor "D" para cada uno y cada uno puede ser utilizado para el monitoreo de rutina. Puesto que las ampollas Prospore están selladas en vidrio no hay posibilidad de que se contaminan al sumergirlas en el líquido, por este motivo representa una ventaja para realizar el monitoreo de la esterilización de líquidos. Esto no significa que la ampolla tenga un desempeño diferente a la tira de espora o a un vial Prospore 2 cuando se sumerge en líquidos. Se debería tener cuidado al colocar la ampolla Prospore para asegurarse que no se moverá o rebotará cuando se introduzca o remueva el vapor de la cámara y de ese modo evitar que se rompa.