ISBN 978-987-46701-4-4

Sección II.

Preservación, Desinfección y Esterilización.

Página

Capítulo II.1. **Desinfectantes y Desinfección de superficies y equipos** **75**
Miguel D'Aquino y Sergio A. Teves

Capítulo II.2. **Esterilización** **89**
Celina Horak y Nora Carbone

A. **Esterilización por Calor húmedo** **96**
Federico Kurt Lungwitz y Nora Carbone

B. **Esterilización con Radiaciones ionizantes** **126**
Celina Horak

C. **Esterilización por Óxido de etileno** **144**
Gustavo Enriquez

D. **Filtración esterilizante de fluidos** **162**
Mino Covo

Capítulo II.3. **Indicadores de esterilización** **180**
Russ Nyberg

Capítulo II.4. **Control de la Validación de un Proceso de Saneamiento** **192**
José E. Martínez

Capítulo II.5. **Conservadores en productos farmacéuticos y cosméticos** **203**
Miguel D'Aquino y Sergio A. Teves

Capítulo II.1.

Desinfectantes y Desinfección de superficies y equipos

Miguel D'Aquino y Sergio A. Teves

Introducción

Factores que inciden en el proceso de desinfección

1. *Efecto final deseado*
2. *Tiempo de contacto*
3. *Carga microbiana*
4. *Tipo de microorganismos presentes*
5. *Tipo de superficie a tratar*
6. *Posible presencia de interferencias*
7. *Preparación de las diluciones*
8. *Temperatura del proceso*

Generación de resistencia a los desinfectantes

Rotación de desinfectantes

Agentes desinfectantes más utilizados

Bibliografía

Introducción

La contaminación microbiana en superficies industriales y nosocomiales ha sido siempre un problema grave que podría llevar contaminaciones de productos, que en definitiva pueden terminar en procesos infecciosos en pacientes. Generalmente estos problemas son reducidos al mínimo a través de programas de limpieza y desinfección (sanitización), utilizando varios compuestos químicos tales como el hipoclorito de sodio, el etanol, sales de amonio de cuaternario, y tensioactivos anfóteros entre otros. [1,2,3]

La eficacia de estos programas es influenciada por diversos factores que es necesario recordar y tener en cuenta.

Factores que inciden en el proceso de desinfección

Estos factores son: [4,5,6,7]

Efecto final deseado
Tiempo de contacto
Carga microbiana
Tipo de microorganismos presentes
Tipo de superficie a tratar
Posible presencia de interferencias
Preparación de las diluciones
Temperatura del proceso

A continuación vamos a analizar cada uno de ellos.

1- EFECTO FINAL DESEADO:

Cuando trabajamos con desinfectantes o mejor dicho con agentes antimicrobianos de uso externo, tenemos dos tipos de respuestas o efectos:

a) Los microorganismos presentes, en contacto con agente aplicado, cesan su replicación (su número permanece constante), sin perder su viabilidad (sin morir). Es lo que llamamos efecto BIOSTÁTICO (BACTERIOSTÁTICO, FUNGISTÁTICO, BIOSTÁTICO)

b) Los microorganismos presentes, al ponerse en contacto por cierto tiempo con el agente aplicado, pierden su viabilidad, con lo cual su número se reduce significativamente, es decir hay muerte microbiana. Esto es lo que llamamos efecto BIOCIDA (BACTERICIDA, FUNGICIDA, VIRICIDA).

Dentro de estos procesos de muerte microbiana podemos definir:

Desinfección: Eliminación de los agentes contaminantes presentes sobre una superficie inanimada. Se suele admitir como desinfección la destrucción del 99,999% de los microorganismos presentes o una reducción de 5 logaritmos del número inicial de ellos.

Cuando hablamos de desinfección sobreentendemos que lo que deseamos es reducir el número de microorganismos presentes y por lo tanto debemos usar agentes BIOCIDAS.

Antisepsia: Es un proceso de desinfección aplicado sobre un ser vivo.

Esterilización: Es la destrucción de **todos** los microorganismos presentes en una superficie, convenientemente acondicionada para evitar su recontaminación y mantener su condición de estéril.

Sanitización: Es la reducción de microorganismos a niveles seguros, ésta ligado al concepto de limpieza. Cuantitativamente se admite como umbral de acción de un sanitizante la destrucción del 99,9% (3 logaritmos) de la carga inicial.

La diferencia entre el efecto Biocida y el efecto Biostático puede verse en el Gráfico 1.

***Gráfico 1**. a) crecimiento microbiano; b) bacteriostasis (biostático); c) muerte microbiana (biocida)*

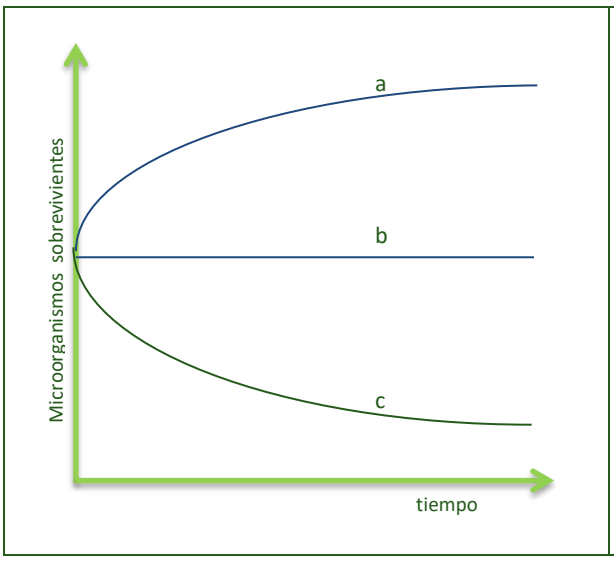
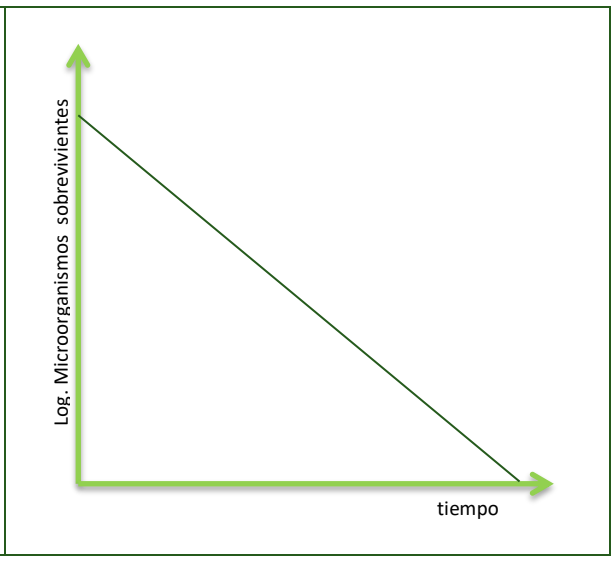


***Gráfico 2**. log N_s vs tiempo; tiempo de contacto.*



2- TIEMPO DE CONTACTO:

La aproximación más común y más simple que se puede hacer a la cinética de muerte microbiana por acción de biocidas es aproximarla a una reacción de orden 1 en donde en cada punto de la curva de muerte, la velocidad depende de la concentración de uno de los reactantes, obteniéndose una expresión del tipo:

$$\text{Log } N_s = \text{Log de } N_0 - K.T$$

donde Ns = número de microorganismos sobrevivientes
N_0 = número inicial de microorganismos
K = Constante de velocidad (depende del microorganismo, del agente empleado y de su concentración)
T = Tiempo

Si graficamos Log N_s vs tiempo nos da idealmente una recta como la del Gráfico 2

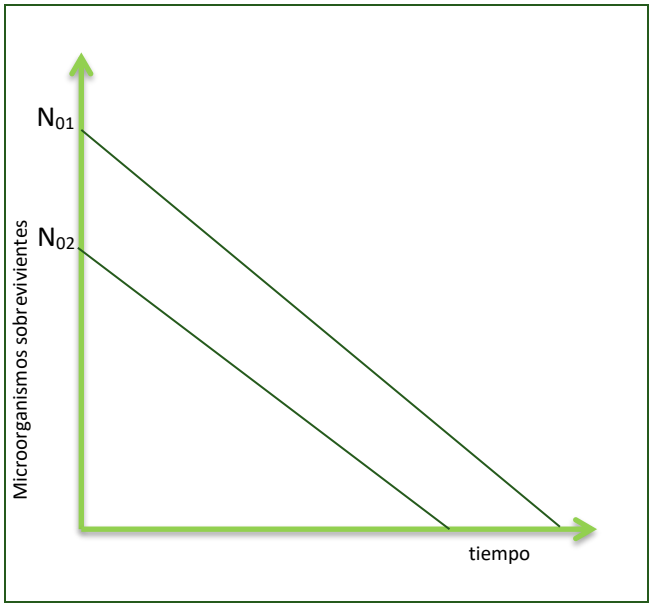
Más allá de la utilidad práctica de esta ecuación lo más importante de esta cinética es siempre tener en cuenta que EL PROCESO DE DESINFECCIÓN NO ES INSTANTÁNEO, requiere un tiempo mínimo para ser llevado a cabo satisfactoriamente.

3- CARGA MICROBIANA

El proceso no sólo no es instantáneo, sino que también depende de la población de microorganismos presentes, la cual representará el N_0 de la ecuación anterior, que nos permite ver muy gráficamente la diferencia de comportamiento de dos poblaciones iniciales (Gráfico 3).

En el gráfico vemos que si bien ambas poblaciones tienen el mismo comportamiento (tienen la misma pendiente o velocidad de muerte), para ELIMINAR LA MAYOR POBLACION SE REQUERE MAYOR TIEMPO.

***Gráfico 3**. log N_s vs tiempo.*



4- TIPOS DE MICROORGANISMOS PRESENTES

Es necesario recordar que diferentes microorganismos tienen diferente sensibilidad a un mismo agente. Esto se debe a la resistencia intrínseca (resistencia innata de un microorganismo) de cada grupo microbiano, la cual puede deberse a diferentes mecanismos.[8]

La Tabla 1 nos resume algunos ejemplos de resistencia intrínseca a desinfectantes.

Esta diferencia de susceptibilidad nos permite ordenar a los diferentes grupos microbianos según su resistencia:

Esporas bacterianas > Micobacterias > Virus pequeños no lipídicos > Hongos > Bacterias (Formas vegetativas) > Virus medianos lipídicos

Tabla 1. *RESITENCIA INTRÍNSECA*

Tipo de Resistencia		Ejemplo	Mecanismo
Impermeabilidad	Gram negativos	Triclosán Amonios cuaternarios	La membrana externa representa una barrera que impide el ingreso del agente
	Micobacterias	Amonios cuaternarios Clorhexidina	La pared de composición compleja y cerosa (altamente hidrofóbica) impide la entrada
	Esporas	Amonios cuaternarios, Fenólicos, Clorhexidina	Las envolturas y la corteza de la espora impiden el ingreso
	Gram positivos	Clorhexidina	Pared, presencia de mucopolisacáridos
Inactivación		Clorhexidina	Ruptura enzimática de la molécula

Esta diferencia entre especies es tan marcada y constante que se utiliza para clasificar a los agentes antimicrobianos en cuanto a su nivel de acción (alto, mediano o bajo). Esta clasificación puede observarse en la Tabla 2, donde los de nivel alto pueden destruir todas las formas microbianas, incluso llegando a destruir esporas, por lo cual pueden ser considerados AGENTES ESTERILIZANTES QUÍMICOS.

Tabla 2. *CLASIFICACIÓN SEGÚN NIVEL DE ACCIÓN*

NIVEL	ACTIVO FRENTE A	COMPUESTOS
Alto	Esporas bacterianas Micobacterias Virus no lipídicos Hongos y levaduras Formas vegetativas Virus lipídicos	Glutaraldehído 2 % Formol 20 % Peróxido de hidrógeno Cloro (> 5000 ppm)
Medio	Micobacterias Virus no lipídicos Hongos y levaduras Formas vegetativas Virus lipídicos	Alcoholes Cloro (<5000 ppm) Yodóforos Clorhexidina Fenólicos
Bajo	Hongos y levaduras Formas vegetativas Virus lipídicos	Amonios cuaternarios Anfóteros Mercuriales

Es necesario destacar que un agente con un determinado nivel de acción no va a aumentar este nivel al incrementar su concentración; por ejemplo, un amonio cuaternario cásico nunca va a llegar a ser de nivel medio,

salvo que se lo combine con otro agente, sinérgico o de mayor nivel de acción como por ejemplo el etanol.

5- TIPOS DE SUPERFICIES

El tipo de superficie a tratar es un dato muy importante, ya que el agente y/o la forma de aplicación debe ser la indicada para la superficie a tratar. Se deben evaluar [9,10, 11,12]:

- *La posibilidad de adsorción del agente*: esto puede jugar de dos formas, una es la fijación a la superficie, pero manteniendo su actividad biocida sobre ella, lo cual puede favorecer su acción residual; la otra posibilidad es una muy fuerte adsorción que impida al agente ponerse en contacto con los microorganismos y por ende reducirá su acción.
- *Efectos corrosivos del agente sobre la superficie*: esta es una gran limitación de muy buenos agentes desinfectantes como los oxidantes que pueden dañar superficies metálicas
- *Contacto entre la superficie y el agente*: La solución del agente debe "mojar" completamente la superficie a tratar, si la superficie es demasiado hidrofóbica deberá usarse una formulación que reduzca la tensión superficial, para que el agente se distribuya en forma homogénea, y cubra perfectamente la superficie contaminada.
- *Presencia de humedad*: Tener en cuenta la posibilidad de dilución del agente en la humedad de la superficie. En este punto conviene recordar que uno de los requerimientos para el desarrollo microbiano es la humedad, por lo tanto una superficie que permanezca húmeda tiene más riesgo de contaminación que una superficie seca.

6- POSIBLE PRESENCIA DE INTERFERENTES

En la práctica de la desinfección casi siempre nos encontramos con superficies y/ o equipos que fueron usados y que puedan contener residuos, estos residuos deben eliminarse completamente antes de la etapa de desinfección, ya que generalmente reducen la acción de los agentes desinfectantes.

La Tabla 3 nos brinda un breve sumario de estas interacciones indeseables.

Tabla 3. *INTERACCIONES INDESEABLES CON AGENTES DESINFECTANTES*

TIPO DE INTERACCIÓN	MECANISMO
Fuerza iónica pH	Intervienen en el grado de disociación de la molécula activa.
Dureza	Puede formar quelatos con algunos compuestos. Estabiliza membranas.
Materia orgánica	Adsorción del desinfectante. Protección física del microorganismo. Reacción con el agente antimicrobiano. Formación de compuestos insolubles.
Compuestos aniónicos	Incompatibles con compuestos catiónicos.

En conclusión, siempre debemos tener presente que NO SE DEBE DESINFECTAR SOBRE LO SUCIO. Previamente a la desinfección siempre debe limpiarse la superficie; aún con formulaciones duales que "limpian y desinfectan" se debe tratar la superficie dos veces, la primera para remover la suciedad y la segunda para desinfectar. [7,8]

7- PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

a) Efecto de la concentración.

La dilución del producto está relacionada directamente a la concentración del agente activo, esta concentración a su vez se relaciona directamente con la eficiencia o con la energía del proceso de desinfección. Cuando decimos eficiencia, nos referimos tanto al nivel de destrucción microbiana (porcentaje de destrucción de la carga inicial), como al tiempo requerido para completar el proceso.

Concentración y Tiempo de desinfección se relacionan según la siguiente expresión:

$$C^{\eta_1} \times T_1 = C^{\eta_2} \times T_2$$

Donde: C = concentración
T = tiempo
η = Coeficiente de concentración = $\frac{\text{Log } T_2 / \text{Log } T_1}{\text{Log } C_1 / \text{Log } C_2}$

Este último parámetro, COEFIENTE DE CONCENTRACIÓN, adquiere una gran importancia práctica ya que nos indica cómo va a comportarse un desinfectante cuando está diluido. Intuitivamente estamos tentados a pensar que, si disminuimos la concentración del agente desinfectante a la mitad, necesitaríamos el doble de tiempo para tener la misma eficiencia de proceso; lo cual no es estrictamente cierto, dado que el tiempo depende de η el cual es una constante para cada producto. En la Tabla 4 a través de varios ejemplos veremos cómo influye este parámetro.

Tabla 4: *EFECTO DE LA DILUCIÓN EN EL TIEMPO DE ACCIÓN DE UN DESINFECTANTE (INFLUENCIA DEL COEFICIENTE DE DILUCIÓN)*

Exponente η	Ejemplo	Aumento del tiempo de acción al diluir al 1/2	Aumento del tiempo de acción al diluir al 1/3
1	Mercuriales – Cetrimide	2	3
2	Clorobutanol	4	9
3,1	Etanol	9	30
5,8	Fenol	55	585
8	Cresol	256	6561

Según surge de la Tabla 4, en el caso de agentes como el Cetrimide con η=1, una dilución a la mitad se compensa con un aumento al doble del tiempo de contacto; pero en casos como el de los agentes fenólicos, en que η > 5, la dilución al medio aumenta tanto el tiempo necesario, que estamos hablando de una neutralización del agente por dilución. Es en este tipo de compuestos con η altos en donde el control de la dilución es crítico ya que pequeñas diferencias de concentración se traducen en grandes diferencias de eficiencia.

b) Uso de agua y recipientes estériles o pasteurizados:

El agua utilizada para llevar el producto a la dilución de uso no debe aportar microorganismos, lo mismo que

los recipientes utilizados

c) *Filtración esterilizante en caso de ser necesario:*

Esto es útil si no disponemos de agua de buena calidad microbiológica o en el caso de los alcoholes, que, si bien es imposible que proliferen bacterias en ellos, pueden vehiculizar esporas bacterianas viables, y se comportan como esporostáticos y al evaporarse las esporas quedan libres para una proliferación, si se dan las condiciones necesarias.

d) *Agua dura:*

El agua dura puede interferir con el agente, por lo que debe evitarse su uso de agua dura, dado que aporta cationes divalentes que pueden estabilizar membranas. Por lo cual se recomienda el uso de agua destilada; en aquellos desinfectantes destinados a aéreas no criticas (como los desinfectantes de uso doméstico) las mismas formulaciones suelen incluir un agente secuestrante (como EDTA), para disminuir la concentración de cationes divalentes.

e) *Caducidad de las diluciones:*

Idealmente se deben emplear diluciones frescas, recientemente preparadas y descartar las mismas al final del día (preparadas en envases estériles o pasteurizados). Como esto en la práctica no siempre es posible, si se va a usar una dilución más de un día, se debe fijar un *Período de caducidad*. Este período va a ser variable en cada lugar y con cada agente, y dependerá de:

- Estabilidad del agente: algunos agentes como el hipoclorito de sodio pierden título con el tiempo.
- Interacciones con el envase: tanto las paredes como las tapas de los envases pueden adsorber agente activo y así disminuir su concentración efectiva en solución.
- Posibilidad de contaminación microbiana de las soluciones diluidas listas para el uso.

Para estimar el período de caducidad se deberán efectuar estudios, en función del tiempo transcurrido desde la preparación de la dilución, que la soporten como ser:

- Medición de la concentración del agente activo.
- Evaluar la aparición de microorganismos contaminantes
- Seguir la actividad biológica (efectividad).

Todos estos estudios deberán ser documentados para cada dilución desinfectante utilizada, salvo que se respete la condición ideal de preparación diaria de las diluciones de uso.

8- TEMPERATURA

Un aumento de la temperatura en desinfección química siempre favorece la acción del desinfectante disminuyendo los tiempos de contacto y aumentando por ende la eficiencia. En procesos de desinfección por calor la temperatura es una medida directa de la energía empleada en el proceso.

Mecanismos de acción:

Si bien estos son los factores fundamentales que condicionan el proceso de desinfección, hay otros temas de importancia que debemos ver antes de dar un repaso de los principales agentes desinfectantes disponibles.

***Tabla 5**: MECANISMOS Y BLANCOS DE ACCIÓN DE AGENTES DESINFECTANTES*

BLANCO	AGENTE	MECANISMO
Pared Celular	Glutaraldehído	Entrecruzamientos en proteínas
	EDTA	Remoción de cationes divalentes, liberación de LPS
Membrana citoplasmática	Amonios cuaternarios	Daño general afectando los fosfolípidos de la bicapa
	Clorhexidina, biguánidos poliméricos	Afectan integridad de la membrana celular con aumento a de la permeabilidad, perdida de Potasio, aminoácidos y macromoléculas, desacople y coagulación citoplasmática (a altas concentraciones)
Macromoléculas	Formol	Entrecruzamientos entre cadenas de DNA, RNA y Proteínas
	Glutaraldehído	
ADN	Acridinas y colorantes básicos	Intercalamiento entre dos bases de la cadena.
	Halógenos, Peróxidos, Ag	Ruptura de hebras e inhibición de síntesis
Grupo Tiol	Metales pesados	Unión al grupo tiol de proteínas unidas a membranas y pérdida de actividad biológica
Oxidantes	Halógenos, peróxidos	Oxidación de grupos funcionales de macromoléculas (SH, SO, SS, Formación de radicales OH*.

Generación de resistencia a los desinfectantes

La resistencia puede ser consecuencia de diferentes "estrategias" microbianas, que pueden darse en forma inducible o permanente:

1- Alteración de los blancos moleculares (modificaciones de las moléculas blanco)

2- Inactivación de agentes por reacciones covalentes (ejemplo, Agentes oxidantes con mucílagos producidos por el germen), o enzimáticas (Formaldehído reductasa)

3- Formación de Biopelículas (biofilm)

4- Disminución del agente en el sitio de acción ya sea por expresión de Bombas de Eflujo (clorhexidina/ amonios cuaternarios), o alteración de estructuras de la membrana externa como la disminución de porinas.

Cualquiera de estos eventos resultará en un aumento de la resistencia al agente antimicrobiano. Algunos genes responsables de estas respuestas han sido caracterizados, pudiendo ser de localización cromosomal o plasmídica.

En líneas generales este aumento de la resistencia a desinfectantes se observa como un aumento o corrimiento en la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), pero siempre este aumento es menor que el de las concentraciones de uso (mensurable sólo en soluciones diluidas).

En el caso de la industria farmacéutica, dada la baja carga microbiana y el tipo de proceso (concentración adecuada del agente, por tiempos cortos con posterior enjuague), hay escasas posibilidades de una presión selectiva que determine un aumento de la resistencia de los microorganismos contaminantes.

Particularmente una situación común en ciertos sistemas (como ser los sistemas de distribución de agua, con

limpieza deficiente y restos de humedad), donde se generan biopelículas, éstas aumentan hasta 100 veces la resistencia y para su remoción requieren tratamiento enzimático y/o acción mecánica que en muchos casos implica la remocion de la válvula o porción de cañería contaminada.

En nuestra experiencia hemos observado contaminación de soluciones desinfectantes, las cuales en su mayoría eran soluciones acuosas de amonios cuaternarios de hasta 1500 ppm (mg/L), y en cuanto a los microorganismos contaminantes (Ver agentes en Tabla 6), demostraron **alta dependencia de sustrato,** que se evidenció en los siguientes hechos:

- El microorganismo aislado perdía rápidamente su resistencia, aún después de un solo repique (aislamiento primario). De hecho, en muchos casos para demostrar la resistencia del mismo hubo que usar la solución contaminada como inóculo.
- Alta viabilidad en el producto desinfectante contaminado, algunos por más de 10 años.
- En un caso particular inclusive el microorganismo no desarrollaba en ausencia del agente.

Como surge de la Tabla 6, el principal agente que hemos aislado en nuestro medio fue *Burkholderia cepacia*, entre otros gram negativos y a veces no sólo se detectó su presencia, sino que se pudo cuantificar llegando a recuentos mayores a 1 x 10^4.

Esto nos recuerda lo visto líneas arriba en cuanto al **cuidado en la preparación de diluciones de uso de los desinfectantes** y lo crítico que resulta este punto.

De hecho, en nuestro laboratorio, además, hemos adaptado experimentalmente, cepas de *Burkholderia cepacia* de origen industrial a diferentes agentes antimicrobianos, si bien la resistencia se determinó por el corrimiento de la CIM, como decimos más arriba, el hallazgo importante es que en las cepas adaptadas se modifica el patrón de resistencia a antibióticos con respecto a la cepa original.

***Tabla 6**. ALGUNOS MICROORGANISMOS HALLADOS EN DESINFECTANTES*

Producto	Microorganismo	Recuento (UFC/mL)
Dx Institucional (Quat)	*Escherichia coli*	ND
Dx Institucional (Quat)	*Burkholderia cepacia*	ND
Dx Institucional (Quat)	*Burkholderia cepacia*	ND
Dx Institucional (Quat)	*Burkholderia cepacia*	ND
Dx Institucional (Quat)	*Burkholderia cepacia*	ND
Dx Institucional (Quat)	*Burkholderia cepacia*	ND
Dx Institucional (Quat)	*Burkholderia cepacia*	ND
Dx Institucional (Quat)	*Burkholderia cepacia*	1.0 X 10^5
Dx Institucional (Quat)	*Burkholderia cepacia*	6.3 X 10^4
Dx Quirúrgico (Quat)	*Salmonella sp*	ND
Dx Iodado (Quat)	*Burkholderia cepacia*	ND
Dx Institucional (Quat)	*Burkholderia cepacia*	180
Dx Institucional (Quat)	*Burkholderia cepacia - Alcaligenes fecalis*	2.8 X 10^4
Dx Institucional (Quat)	*Burkholderia cepacia*	3.4 X 10^4
Dx Institucional (Quat)	*Burkholderia cepacia*	500
Dx Institucional (Quat)	*Citrobacter freundii*	480

ROTACION DE LOS DESINFECTANTES

¿Por qué rotar?

En primer lugar, **para cumplir con las directivas vigentes en GMP**. Estas toman directivas de la FDA, que se basan en la suposición de que los desinfectantes se comportan como los antibióticos, en el hecho que generan resistencia con el tiempo.

Esto es cierto para los Antibióticos, pero **No existe evidencia que ocurra para desinfectantes en las condiciones de uso.** Esto es así porque el proceso de desinfección es muy enérgico (cuando está bien realizado) y no deja una población de supervivientes lo suficientemente alta como para que se establezca una población resistente.

O sea, la probabilidad de que la flora contaminante de una superficie se vuelva resistente al proceso de desinfección, si éste es adecuado, es muy baja si es que existe.

Los estudios que demuestran adaptación microbiana a desinfectantes están realizados estudiando el comportamiento de los microorganismos frente a concentraciones de agente muy inferiores a las que se usan en la práctica y esa adaptación, fenotípicamente se evidencia en el corrimiento de la Concentración Inhibitoria Mínima, que es inferior a la concentración bactericida.

Lo que sí existen son errores de aplicación y la contaminación de las soluciones diluidas de los desinfectantes. De hecho, de nuestra experiencia todas las contaminaciones de equipos en planta fueron secundarias a fallas en el proceso de lavado previo a la sanitización y/o al diseño de los equipos que dificultaba el lavado, con lo cual la desinfección perdía efectividad debido a la suciedad acumulada y a la comunidad microbiana desarrollada en la misma.

Si bien muchos autores apoyan la idea de que si un desinfectante funciona bien no debería ser cambiado, debido a las normativas vigentes y a una posible contingencia, es necesario tener más de un desinfectante disponible entre nuestras herramientas.

La USP 40 recomienda que al menos semanal o mensualmente, se realice una desinfección con un agente esporicida, no es recomendado el uso diario de estos, ni con frecuencias mayores, debido a la acción corrosiva que suelen tener sobre los materiales, sobre todo metálicos.

AGENTES DESINFECTANTES MAS UTILIZADOS [13,8,10,16,5,6]

1- ALCOHOLES

Los alcoholes más usados son el etanol y el isopropanol, ambos se usan al 70 % dado que a esa concentración expresan su mayor poder desinfectante.

Ejercen su acción dañando membranas celulares y desestabilizando proteínas.

El espectro de acción de estos agentes es **intermedio**, No son esporicidas, pero son esporostáticos. En cuanto a las diferencias entre ellos, el Isopropanol tiene más acción bactericida y el etanol más acción virucida.

Presentan sinergia con otros agentes, como amonios cuaternarios, biguánidos, álcalis y ácidos. Son muy usados en antisepsia y desinfección, conservación y limpieza, en este último caso utilizado luego del enjuague favorece y acelera el secado. USP lo recomienda para la remocion de residuos de otros agentes.

Si analizamos su toxicidad, estos agentes son irritantes, volátiles e inflamables, siendo el mayor riesgo el de incendio.

2- ALDEHIDOS

a) Formaldehido:

Fue y es ampliamente utilizado. Su acción se ejerce por alquilación de grupos C=O, SH, -OH, NH_2 de proteínas y/o de ácidos nucleicos.

Es un agente de alto nivel, por lo cual tiene acción esporicida y puede considerarse un esterilizante químico.

Su espectro de uso es amplio, desde su uso como agente esterilizante en una concentración al 20% y por un tiempo de varias horas; desinfección de alto nivel (20 minutos), desinfectante de superficies (8%), desinfección de ambientes (5g/ m^3/ 4 hs) (aplicable a la desinfección de cabinas de flujo laminar) o como conservador al 0,1%. En cuanto a este último uso en nuestro medio está prohibido en domisanitarios, pero su uso está permitido en cosméticos que se utilizan con posterior enjuague.

Sus puntos negativos los da su patrón de toxicidad, dado que es irritante, hipersensibilizante, y fundamentalmente fue catalogado por la OMS como probablemente carcinógeno para el hombre. Cuando se usa para la desinfección de grandes áreas o equipos se deben usar los elementos de seguridad adecuados para evitar la exposición de la piel y su inhalación.

Cuando se usa para la desinfección ambiental en forma gaseosa (aire o cabinas de flujo laminar), el área a tratarse debe ser evacuada durante todo el tratamiento y antes de permitir el ingreso de personas, debe neutralizarse con vapores de amoníaco y/o ventilarse perfectamente.

Sus puntos favorables son su bajo costo, su disponibilidad en el mercado, su potencia y el hecho que la interferencia por dureza y materia orgánica es mínima.

b) Glutaraldehído:

Al igual que el agente anterior el Glutaraldehído ejerce su acción frente a diferentes grupos funcionales de macromoléculas, pero además al ser una molécula divalente (con dos grupos reactivos), tiene una fuerte unión a grupos amino de pared y membrana celular, e inhibe funciones como el transporte de electrones. Sus dos funciones aldehído tienen la distancia óptima para producir entrecruzamiento en la cadena de DNA.

Es un desinfectante de alto nivel. Su principal uso es como esterilizante químico al 2% y por un tiempo de contacto que va de 6 a 12 hs es muy usado como desinfectante de alto nivel (2%, 20 minutos de acción) y está siendo usado como agente conservador en productos domisanitarios.

En cuanto a su toxicidad es menos tóxico que el formol, pero en algunas personas puede producir hipersensibilidad.

A consecuencia de sus dos grupos reactivos, debe extremase la limpieza previa, dado que puede fijar materia orgánica a las superficies tratadas.

3-HALOGENOS

En esta categoría ubicamos a agentes que generan cloro activo como: Hipoclorito de sodio, Dióxido de cloro, Dicloroisocianurato, Cloramina T, etc.

En todos los casos, dado que actúan a través del cloro activo, son productos oxidantes que ejercen su efecto oxidando grupos funcionales de macromoléculas. Son agentes de alto nivel, con una multiplicidad de usos:

- Desinfección de alto nivel a concentración equivalente de más de 5000 ppm (mg/L) de cloro
- Desinfección fuerte - 250-500 ppm
- Desinfección de superficies, sistemas de diálisis, lactarios, etc. - 250 ppm
- Antiséptico, Sanitizante - 50 ppm
- Potabilizante de agua -0,2 a 0,5 ppm

Son agentes que se afectan poco por la dilución, no son afectados por la dureza del agua, pero son inactivados por materia orgánica y agentes reductores, tienen dependencia del pH y son inestables por encima de 50ºC (más estables a temperatura ambiente, pero su concentración decae con el tiempo), pero el factor principal que limita su uso es que es corrosivo para superficies metálicas.

Si analizamos sus características toxicológicas, son agentes irritantes y se discute la importancia de los productos tóxicos que se forman al ser usados como potabilizantes de aguas naturales sin tratamiento previo.

Son con lejos, los que poseen mejor relación precio /actividad, dado que son muy activos y baratos (sobre todo el hipoclorito)

Otra subcategoría dentro de los Halógenos son los agentes Iodados, representado por las tinturas de Iodo o más comúnmente usados, Iodóforos como la Iodopovidona. Estos agentes también son de alto nivel, se usan

ampliamente como antisépticos, incluso prequirúrgicos y en la desinfección de agua. También existen formulaciones para la desinfección de superficies industriales, fundamentalmente industrias agrícolas y de alimentos

4- ACIDO PERACÉTICO

Es una agente oxidante cuya función se ejerce por oxidación de grupos funcionales de proteínas y ácidos nucleicos, y por desnaturalización proteica.

Es un potente agente de alto nivel, siendo esporicida en concentraciones de 0,3%.

Al ser oxidante a su acción desinfectante se suma la acción desodorizante, por lo cual es ampliamente usado en la desinfección de objetos y superficies.

Presenta varias ventajas en su uso, la principal es que se degrada a compuestos inocuos como son el agua y el ácido acético, es poco afectado por la materia orgánica y la dureza, a concentraciones de uso resulta no tóxico ni irritante (salvo ojos).

Las soluciones concentradas deben manipularse con cuidado dado que estas penetran la piel produciendo quemaduras y los vapores emanados son sumamente irritantes.

5-PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Es un elemento oxidante y como tal su acción se ejerce por oxidación de grupos funcionales de macromoléculas incluyendo C=C de lípidos; en fase gaseosa genera el radical libre OH*.

Es un agente de alto nivel, usado a concentraciones mayores al 10% tiene acción esporicida, y al ser oxidante se le suma el efecto desodorizante.

Es ampliamente usado en la antisepsia y limpieza de heridas, desinfección de objetos y superficies y esterilización de material crítico, (como es el caso de aisladores).

La ventaja principal es que luego de ejercer la su acción se degrada a compuestos totalmente inocuos como lo son el oxígeno y el agua.

6-AGENTES FENÓLICOS

Son agentes de espectro de acción **intermedia**, más activos frente a gram positivos, con algo menos de actividad frente a Pseudomonas y hongos, pero con fuerte acción frente a Micobacterias.

Su modo de acción consiste en producir un daño en la membrana, que aumenta la permeabilidad a los protones que produce un desacople de la fosforilación oxidativa; a concentraciones mayores a esta acción se le suma la coagulación de proteínas citoplasmáticas.

Se antagonizan con cationes divalentes (aguas duras) y medio alcalino, pero resisten la carga de materia orgánica. Son sinérgicos con EDTA.

El agente tipo es el Fenol habitualmente usado a 5%; su uso esta relegado por ser irritante y su olor penetrante.

Son más utilizados sus derivados: Hexaclorofeno, O-Fenilfenol, y Cloroxilenol; participan en la formulación de diversos jabones y antisépticos; el O-fenilfenol es el componente más utilizados de los desinfectantes de ambiente en aerosol.

Estos agentes también son agentes hipersensibilizantes, particularmente para los infantes.

Este grupo en general está siendo regulado dado su toxicidad ambiental y su dificultosa biodegradación.

7-AMONIOS CUATERNARIOS.

Es el grupo que más se desarrolló en los últimos años siendo los más utilizados en diversas aplicaciones. Su acción se ejerce en varias etapas, la primera es la adsorción a la pared bacteriana, luego reacciona con la membrana plasmática conduciendo a su desorganización, con la consecuente pérdida de solutos de bajo peso molecular; la acción prosigue con degradación de macromoléculas y lisis celular.

Si bien son agentes de bajo nivel (pueden tener actividad esporostática y micobacteriostática), son agentes que poseen muy baja toxicidad y su molécula le confiere propiedades detersivas que ayudan el proceso de limpieza.

Su acción es antagonizada por materia orgánica, compuestos aniónicos, jabones, nitratos, Lecitina, ácido bórico y agua dura (cationes divalentes). Si actividad se sinergiza en formulaciones con EDTA, Alcoholes y Clorhexidina.

Entre los derivados más utilizados encontramos al Benzalconio, Benzetonio, Cetrimida, Lapirio y derivados de última generación que son mezclas de cuaternarios.

Entre las aplicaciones se encuentran la antisepsia preoperatoria, antisepsia de mucosas, antisepsia de manos, desinfección de superficies no críticas y la desodorización; el benzalconio es muy utilizado en los productos de higiene y desinfección domestica e institucional.

8- BIGUANIDOS

Su acción la ejercen en un primer paso sobre las envolturas celulares, dañando la funcionalidad de la membrana plasmática y luego penetra y coagula el citoplasma.

Son agentes de nivel medio con acción más reducida sobre *Pseudomonas* y *P. vulgaris*.

El agente tipo es la clorhexidina, si bien en el mercado hay derivados poliméricos más modernos como el PHMB (Poliexa metilen biguanido). La clorhexidina es muy usada en desinfección en general fundamentalmente en la desinfección de manos donde por su adsorción a la piel presenta acción residual.

Los derivados poliméricos son muy usados en desinfección en general, desinfección de natatorios y desinfección de superficies, aun las que se encuentran en contacto con alimentos dado a su escasa toxicidad.

Los biguanidos presenta acción a concentraciones de 200 mcg/ ml.

Su accionar se ve afectado por agentes aniónicos, no iónicos, carbonatos y además se adsorbe sobre gomas, alginatos, derivados de la celulosa y sólidos finamente divididos. Son sinérgicos con alcohol y cetrimida.

Bibliografía

1. *Antimicrobial activity on glass materials subject to disinfectant xerogel Coating*. G. J. Copello, S. Teves, J. Degrossi, M. D'Aquino, M. F. Desimone, y L. E. Diaz. J. Ind Microbiol. Biotechnol. (2006) 33: 343–348.
2. *Proving the antimicrobial spectrum of an amphoteric surfactant-sol-gel coating: a food-borne pathogen study*, G. J. Copello, S. Teves, J. Degrossi, M. D'Aquino, M. F. Desimone, L. E. Daz. J Ind Microbiol Biotechnol (2008) 35:1041–1046.
3. USP 40 <1072>. *Desinfectants and Antiseptics*.
4. *Sterilization Principles and Practice of Disinfection, Preservation & sterilization* Russell, Hugo & Ayliffe's. FOURTH EDITION. Blackwell Publishing .2004
5. *Pharmaceutical Microbiology*, Hugo and Russell, Seventh editions, Blackwell Science 2004.
6. *Desinfecciòn, desinfectantes, limpieza*. Miguel D Àquino, Roberto Rezk, Editorial Universitaria de Buenos Aires, 1995.
7. *Saneamiento, Higiene y Sanidad*. Editorial Marchi 1999.
8. *Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides*. D. Russell. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2003) **52**, 750–763.
9. APIC guidelines for selection and use of disinfectants, AJIC, Vol 24, Nro 4, pp 314-342, august 1996.
10. *Draft Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities***,** William A. Rutala, Ph.D., M.P.H., David J. Weber, M.D., M.P.H., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee CDC cleared 2/11/2002/WAR corrected and returned to CDC 2/20/2002.
11. *Cosmetic Microbiology a Practical Approach*, Phillip A. Geiss. Second Edition, Taylor and Francis Group.2006.
12. CTFA Cleaning & Sanitization Guidelines. Draft 2001.
13. *Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and resistance* Gerald Mcdonnell and a. Denver Russell. Clinical Microbiology Reviews, Jan. 1999, p. 147–179.
14. *Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disifenctants*: *an increasiling important area of investigation*. A. D. Russell. Journal of antimicrobial chemotherapy, (2002) 49, 597-599.
15. *Mechanisms of action of antibacterial biocide*. S.P. Denyer. International Biodeterioration y Biodegradation (1995) 227-245.
16. PROEF (Programa de Educación y Actualización Farmacéutica.) Tercer ciclo Modulo 3. "*UD6 Actualización sobre el empleo de antisépticos y desinfectantes*. D´Aquino Miguel, Teves Sergio, Degrossi Jose. Ed. Panamericana 2001.pp 151-178.

Capítulo II.2.

Esterilización

Celina Horak y Nora Carbone

Generalidades

Cinética de inactivación de microorganismos / Concepto de SAL

Métodos de esterilización

- *Esterilización por agentes físicos*
- *Esterilización por agentes químicos*

Consideraciones generales de la Validación de los procesos de esterilización

Vida útil de los productos esterilizados

Aplicación en productos médicos, incompatibilidades y limitaciones del método

Bibliografía

Generalidades

Se denomina esterilización al proceso validado por medio del cual se obtiene un producto libre de microorganismos viables.

El proceso de esterilización debe ser diseñado, validado y llevado a cabo de forma reproducible, de modo de asegurar que es capaz de eliminar la carga microbiana del producto o un desafío más resistente.[1,2].

La selección del método de esterilización para un producto se basa en una serie de factores, que incluyen compatibilidad de materiales, disponibilidad de procesos, ubicación del lugar de procesamiento, atributos del dispositivo, requisitos regulatorios, volumen de procesamiento, velocidad de comercialización, costos y registro regulatorio dentro de los países en los que dispositivos médicos o productos deben ser distribuidos y utilizados, entre otros. Una vez seleccionado, el proceso se valida y se obtiene la aprobación de la autoridad reguladora pertinente.

En los últimos años, las técnicas de esterilización han adquirido una importancia creciente debido a la variedad y cantidad de productos estériles requeridos. Muchos de estos productos tienen requerimientos especiales, para los cuales se requiere de un análisis de riesgos en el diseño del producto, que permita seleccionar el proceso de esterilización más adecuado y con resultado satisfactorios. Por esta razón, cuando se planea fabricar productos médicos o medicamentos estériles debe considerarse una serie de elementos esenciales:

a) Selección de materias primas y componentes o preparación del material de manera tal que la carga microbiana sea mínima (tipo y cantidad de contaminación microbiana a ser inactivada por el proceso de esterilización)

b) Selección del material de envase que sea compatible con el proceso de esterilización.

c) Aplicación de un tratamiento esterilizante adecuado que sea compatible con los productos y envases a esterilizar.

d) Validación y control de rutina del proceso de esterilización.

e) Almacenamiento y transporte adecuado de los productos estériles.

f) Suministro, apertura y utilización de los productos estériles sin recontaminación.

La atención a cada uno de estos elementos esenciales proporcionará la seguridad máxima para que los productos presenten el menor riesgo posible al momento de usarlos.

La esterilización puede realizarse de 3 maneras:

a. Por métodos destructivos;
b. Por muerte o inactivación; y
c. Por eliminación con medios físicos.

Los *métodos destructivos* son procesos muy drásticos, que en la mayoría de los casos implican calentamiento apreciable del material, o el uso de agentes oxidantes. Estos métodos, aunque son efectivos, están muy restringidos en su empleo porque pueden también afectar al material que se quiere esterilizar.

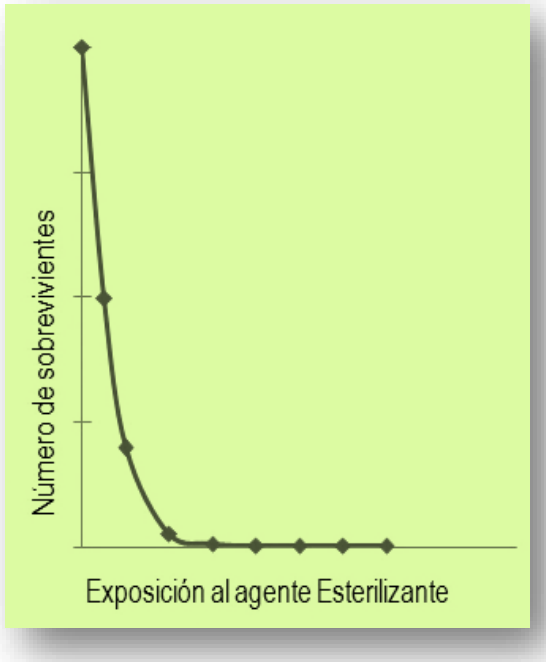
La *muerte o inactivación* significa la eliminación de microorganismos sin que exista necesariamente desintegración de las células. Se puede efectuar por calentamiento, seco o húmedo, por radiaciones o por agentes químicos.

La *eliminación física* por filtración está restringida a la esterilización de sustancias gaseosas o líquidas, y es llevada a cabo fundamentalmente por filtración mediante filtros absolutos o filtros fibrosos.

Cinética de inactivación de microorganismos

Dado que la esterilidad no puede demostrarse de manera absoluta, sino habría que ensayar todas las unidades del lote de producto terminado, se define la esterilidad en términos probabilísticos, en donde la probabilidad de que una unidad de producto esté contaminada es aceptablemente remota.

Cuando una población de microorganismos es expuesta en forma constante a un agente esterilizante, hay una disminución progresiva de microorganismos que sigue una curva exponencial negativa que tiende a cero, pero nunca lo alcanza (Figura 1).



$$N = N_0 e^{-kT}$$

Donde:

N_0: número inicial de microorganismos

T: exposición de agente esterilizante (puede ser dosis o tiempo)

N: número de organismos sobrevivientes a la T

k: constante de muerte, propia para cada tipo de organismo y condición del proceso.

***Figura 1**: Curva de inactivación de una población microbiana por exposición a un agente esterilizante*

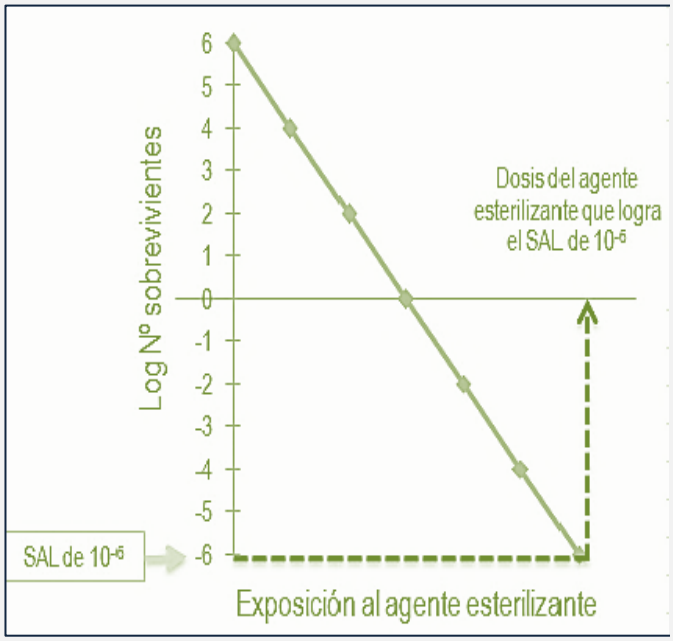
Si se grafica el logaritmo del Nº de microorganismos sobrevivientes en función de la exposición al agente esterilizante, se va a obtener un gráfico semejante al de la Figura 2, donde el efecto del agente esterilizante es reflejado en una reacción cinética de primer orden con pendiente negativa. La pendiente de la recta está determinada por las condiciones de esterilización y por la resistencia del microorganismo. La inversa de la

pendiente es el valor D, que equivale a una reducción logarítmica o la reducción de un 90% de una población microbiana.

Para los fines prácticos se define el concepto de Nivel de Seguridad de Esterilidad (SAL) para describir la población microbiana que fue destruida por un proceso de esterilización.

El SAL es la probabilidad de que una unidad de producto no sea estéril después que ha sido sometida a un proceso de esterilización.

Para etiquetar un producto como "estéril", se deben cumplir requisitos específicos de validación y monitoreo de rutina del proceso de esterilización, demostrando que se alcanza un SAL de 10^{-6}, equivalente a la probabilidad de encontrar un microorganismo viable en una unidad de producto entre 1 millón de unidades de productos, después de haberlos sometido a un proceso de esterilización [4].



$$Log\ N = Log\ No - \frac{T}{D}$$

Donde:

N: número de organismos sobrevivientes a la T

N_0: número inicial de microorganismos

T: exposición de agente esterilizante (puede ser dosis o tiempo)

D: exposición del agente esterilizante (puede ser dosis o tiempo) para lograr una reducción logarítmica

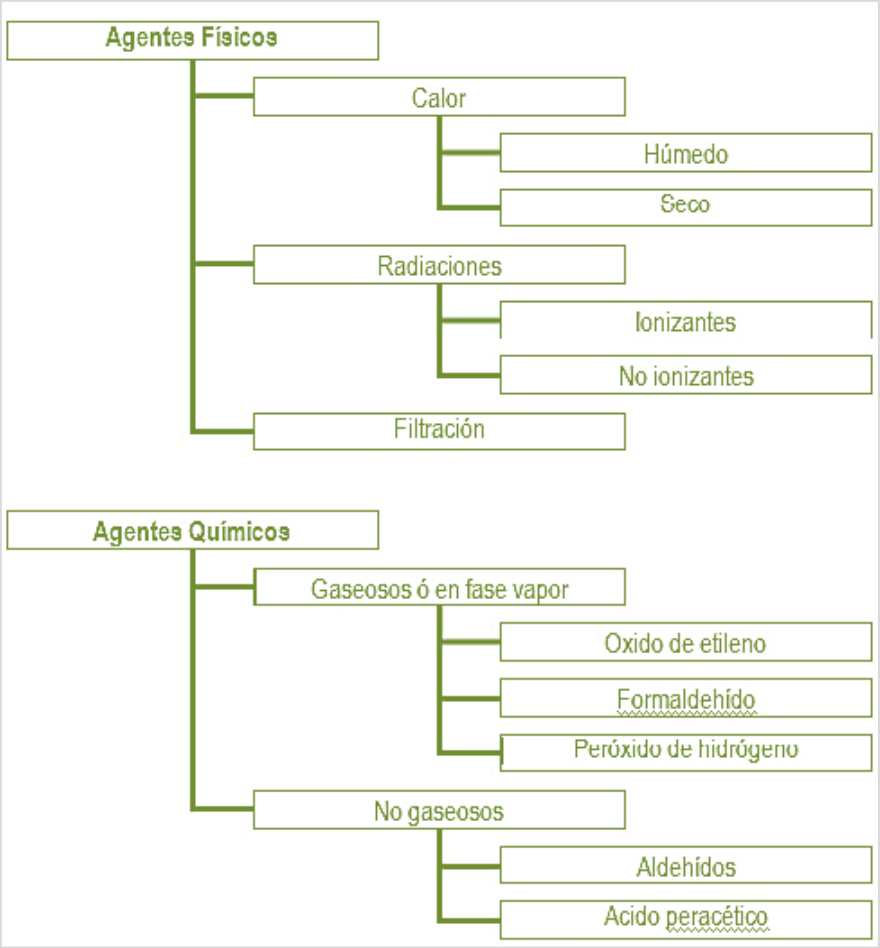
$$\mathbf{T\ (SAL\ 10^{-6})} = D(Log\ No - Log\ \mathbf{10^{-6}})$$

Figura 2: *logaritmo del Nº de sobrevivientes de una población microbiana en función de su exposición al agente esterilizante*

Métodos de esterilización

El procedimiento a utilizar en la esterilización de un dispositivo de uso médico, medicamento, materia prima o envase queda determinado en gran medida por la naturaleza del producto. Es importante recordar que una misma técnica de esterilización no puede aplicarse universalmente debido a que determinadas propiedades de algunos productos pueden modificarse o destruirse. Los métodos de esterilización se pueden clasificar según se realice con agentes físicos y químicos según la Figura 3.

Figura 3: *Agentes físicos y químicos de esterilización.*



Para llevar a cabo los procesos de esterilización se requiere: Instalaciones y suministros calificados; Equipamiento calificado y con mantenimiento preventivo periódico; Precauciones para disminuir la carga microbiana inicial del producto hasta un valor mínimo; Procesos de esterilización validados; Personal calificado y entrenado; Controles sobre el ambiente y sobre el personal; Monitoreo y registro de los procesos de rutina

A continuación se detallan las características generales de los métodos de esterilización de mayor utilización.

1. *Esterilización por agentes físicos*

El calor se puede aplicar como agente esterilizante de dos formas: el calor húmedo, el cual destruye a los microorganismos por desnaturalización de las proteínas, y el calor seco que destruye a los microorganismos por oxidación de sus componentes celulares.

La radiación, o emisión y propagación de la energía a través de un medio, puede ser utilizada como agente para la inactivación de microorganismos por su efecto sobre los ácidos nucleicos principalmente. Las radiaciones ionizantes (gamma, electrones acelerados o Rayos X) son altamente penetrantes, lo que permite esterilizar grandes volúmenes, mientras que las radiaciones no ionizantes sólo pueden ser utilizadas para esterilización de superficies, ya que no son penetrantes por su baja energía (ej. luz ultravioleta).

La filtración es el único método no letal que permite remover los microorganismos presentes en el producto, reteniéndolos sobre la superficie de un material filtrante.

2. *Esterilización por agentes químicos*

Tienen la capacidad de reaccionar con gran facilidad con diferentes grupos funcionales de ácidos nucleicos y proteínas modificando estos componentes esenciales de los microorganismos y alterando su viabilidad.

Los agentes químicos gaseosos, como el óxido de etileno y el formaldehído son alquilantes que inutilizan grupos funcionales responsables de actividades vitales de las células. El formaldehído es un gas fácilmente soluble en agua que se utiliza vaporizado en cámara cerrada en concentraciones desde un 2 a un 40 %, en la esterilización hospitalaria y en la industria farmacéutica. Se emplea asimismo como desinfectante de superficies.

Otros aldehídos y diversos agentes químicos no gaseosos se utilizan en solución principalmente para la esterilización o desinfección de materiales por inmersión.

Consideraciones generales de la validación de los procesos de esterilización

Todos los procesos de esterilización se deben validar para poder asegurar la efectividad de los mismos, y controlar, para verificar su cumplimiento en los sucesivos lotes de esterilización.

La validación de cualquier método de esterilización debe comprender como mínimo los siguientes puntos [1,4]:

1. Especificaciones del producto.

Se debe considerar el efecto del agente esterilizante sobre los materiales del producto y sus envases.

Se debe establecer la intensidad mínima del tratamiento, teniendo en cuenta:

a. El SAL
b. El recuento microbiano del producto antes del tratamiento de esterilización
c. El valor D de la población microbiana tomada como referencia o del testigo biológico utilizado
d. El acondicionamiento del producto en el esterilizador, considerando la uniformidad y diseño de la carga.

Cuando el producto no sea para usar una única vez, se debe establecer la compatibilidad de la reesterilización con el método empleado validado. Se debe definir condiciones de sobreintensidad de tratamiento respecto al deterioro del producto y sus envases y/o su funcionalidad

2. Calificación de la instalación

Consiste en verificar el cumplimiento de las especificaciones de diseño, las características de construcción, y verificar la correspondencia de todos los componentes del equipo y planos; verificar la calidad, capacidad, presión, tipo y pureza (de ser aplicable) de todos los suministros e instrumentos.

3. Calificación de operación

Consiste en verificar que todos los componentes del equipo funcionan de acuerdo a lo especificado. Se evalúa la operación normal de todos los dispositivos del equipo y se debe poner en evidencia la uniformidad y reproducibilidad de las variables críticas del proceso, sin carga de producto o también pude ser con carga simulada.

4. Calificación de desempeño.

Se debe demostrar en forma documentada que el equipo opera de acuerdo con las especificaciones del proceso, lo cual está definido por las especificaciones de producto Para estos efectos, es necesario definir el tipo y patrón de carga a esterilizar considerando los artículos y sus respectivos empaques. El patrón de carga es un aspecto crítico en relación a la distribución del calor o del agente esterilizante dentro de la cámara. Para controlar la distribución del agente esterilizante en el patrón de carga, se debe establecer la calidad, cantidad y ubicación de los monitores a colocar en cada ciclo de esterilización. Los monitores son dispositivos sensibles

al agente esterilizante que permite cuantificar la intensidad de tratamiento de los productos por ciclo de esterilización.

Se deberá realizar además la revalidación del proceso de esterilización con una periodicidad establecida, o cuando se hayan modificado los envases, el proceso o el equipamiento.

Los resultados obtenidos en la validación y revalidaciones del proceso se deben registrar y conservar por un tiempo determinado (mínimo de 2 años después de la validación)

Existen normas internacionales que sirven de guía para cumplimentar las etapas de la validación de un método de esterilización. La norma ISO 14937 [5], se puede aplicar a cualquier método esterilizante, aunque para los métodos de esterilización más utilizados, como los mencionados en la Tabla 1, existen normas específicas. La validación y control de rutina de los métodos de esterilización más utilizados serán descriptos en los capítulos correspondientes.

Cuando el proceso ha sido validado para un determinado producto, los parámetros mínimos a controlar y registrar en cada ciclo de esterilización, según el método utilizado son los indicados en la Tabla 1.

Tabla 1: *Parámetros mínimos a controlar y registrar.*

Parámetro o factor	Calor seco	Vapor	Gases	Radiación ionizante		
				Gamma	Haces de e	Rayos X
Tiempo	Si	Si	Si	Si (dosis)	Si (dosis)	Si (dosis)
Temperatura	Si	Si	Si	No	No	No
Presión	No	Si	Si	No	No	No
Vacío	No	Si	Si	No	No	No
Concentración o difusión	No	Si	Si	No	No	No
Humedad	No	Si	Si	No	No	No
Variación energía	No	No	No	No	Si	Si
Monitores	Si	Si	Si	Si	Si	Si

Vida útil de los materiales esterilizados

Una vez que un material está esterilizado puede mantener la condición estéril si se encuentra protegido en la forma apropiada. Es decir, la duración de la esterilidad de un material no está relacionada directamente con el tiempo, sino con factores que comprometen su exposición al medio ambiente.

La vida útil de los productos médicos está determinada por 3 principios fundamentales:

- La aplicación de procesos de esterilización validados y controlados;
- La estabilidad de los materiales que componen el producto, lo que determinará el mantenimiento de las propiedades físico-químicas, la funcionalidad y biocompatibilidad;

- La estabilidad de los materiales que componen el envase (incluidos adhesivos y selladuras), lo que determinará el período de tiempo que funcione como barrera microbiana, mecánica y sin interacción con el producto médico (no tóxico)

Aplicación en productos médicos y limitaciones del método

En la Tabla 2 se muestran las limitaciones y ejemplos de aplicación de los diferentes métodos de esterilización.

Método	Limitaciones	Ejemplos de aplicación
Calor húmedo	No permite esterilizar soluciones que formen emulsiones con el agua Es corrosivo sobre ciertos instrumentos metálicos. Se debe secar el material	Medios de cultivo, diluyentes, textiles, Instrumental y material de curación hospitalarios. Conservas alimenticias
Calor seco	Son necesarias altas temperaturas, con lo cual los instrumentos a esterilizar pueden ser deteriorados por el excesivo calor.	Polvos inertes, sustancias oleosas, material metálico y algunos materiales de vidrio
Radiación	Se requiere instalaciones especiales; No se recomienda la esterilización de soluciones.	Productos médicos, envases de productos farmacéuticos Insumos hospitalarios y de laboratorio, Productos alimenticios Materias primas farmacéuticas y cosméticas, productos cosméticos y medicamentos
Óxido de etileno	Requiere instalaciones especiales; es necesario ventilación forzada de los productos previo a su uso	Productos médicos Especias alimenticias Insumos hospitalarios Principios activos sólidos deteriorables por radiación, equipos electrónicos, bombas cardiorrespiratorias
Filtración	Solo soluciones o gases filtrables; no retienen virus ni micoplasmas	Gases medicinales o ambientales Soluciones oleosas o soluciones termolábiles

Tabla 2: *Métodos de esterilización, sus limitaciones y aplicación.*

Bibliografía

1. Farmacopea Argentina Edición 7, (Cap 475).
2. Block, S.S: *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 5th edition, Part IV. Lippincott, Williams and Wilkins, 2000
3. Russell, A.D.; Hugo, W.B.; Ayliffe, G.A.J.: "*Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, 3rd edition; Part III. Blackwell Scientific Publications; Oxford, 1999
4. Ministerio de Salud y Acción Social Nº 255/94.
5. UNE-EN ISO 14937. *Esterilización de productos sanitarios. Requisitos generales para la caracterización de un agente esterilizante y para el desarrollo, la validación y el control de rutina de un proceso de esterilización para productos sanitarios*. Mayo 2010.

Capítulo II.2.A

Esterilización por Calor

Federico Kurt Lungwitz y Nora Carbone

Fundamentos y características del método

Principios físico–químicos en la esterilización por Calor – Variables termodinámicas

Esterilizadores por Calor húmedo (autoclaves)

Esterilizadores por Calor seco (estufas)

Proceso por Calor húmedo: sistemas y ciclos aplicables a diferentes productos

Proceso por Calor seco

Empaques y envases para la esterilización terminal

Validación del proceso de esterilización

Recalificación del proceso

Monitoreo periódico y control de ciclos de rutina

Liberación de la carga

Aplicación hospitalaria e industrial de la esterilización por calor

Incompatibilidades y limitaciones

Bibliografía

Fundamentos y características del método

El vapor de agua saturado bajo presión a temperaturas ≥ 121 ^{0}C constituye el agente esterilizante de elección por sobre cualquier otro método alternativo, destruyendo las formas esporuladas de las bacterias en un corto tiempo de exposición. [1,2]

El calor asociado a humedad produce la destrucción microbiana por medio de la desnaturalización irreversible de enzimas y proteínas estructurales. [1,3].

El vapor de agua en su punto de saturación, a la temperatura de condensación, es un medio mucho más eficiente para la destrucción de microorganismos que el calor seco o que el agua a la misma temperatura. Por ejemplo, a una temperatura de 100 °C, la cantidad de calorías cedidas por el vapor saturado es siete veces superior que el disponible en la misma masa en gramos de agua en ebullición. [3]

Las formas vegetativas de las bacterias no sobreviven a la exposición al calor húmedo por más de 10 minutos a 80 °C o 15 minutos a 73 °C, mientras que las formas esporuladas requieren exposición a temperaturas mucho más elevadas. [3]

Esta resistencia elevada al calor se explica por la composición química de la pared celular de las bacterias. En las formas esporuladas tanto aerobias como anaerobias de diferentes bacterias Gram positivas, de un 5 a un 15 % de su peso en seco consiste en ácido dipicolínico, sustancia que bajo la forma de sal cálcica es la principal responsable de su elevada resistencia al calor [1]. Los tiempos de muerte térmica de hongos y protozoos expuestos al calor húmedo son similares a los hallados para bacterias no formadoras de esporas [3]. La mayoría de los virus

se inactivan por calor húmedo a 60 °C dentro de los 20 minutos, con excepción del virus de la Poliomielitis y el de la Hepatitis B, que requieren para su inactivación tiempos de exposición mayores y temperaturas más elevadas [3].

El tiempo y la temperatura estándar mínimos recomendados para la esterilización por vapor de agua saturado, son los que corresponden a la exposición real del producto, durante 15 minutos a 121 °C [2,3]

Como excepción, el agente causal del síndrome de Creutzfeldt–Jakob es el de más alta resistencia al calor húmedo, requiriéndose para su inactivación un ciclo de exposición al vapor de agua de 18 minutos a 134 °C, siendo este tratamiento el de elección para su inactivación en caso que no se opte por la incineración. [3]

La esterilización por calor seco, es decir mediante aire caliente, es mucho menos efectiva que la esterilización por calor húmedo; requiriendo el calor seco tiempos de exposición mayores y temperaturas más elevadas, para alcanzar resultados similares al calor húmedo [1,3]

Para comparar la eficiencia de ambos métodos de esterilización, se puede citar a Perkins (1960) que menciona en su texto las diferentes temperaturas de coagulación para la albúmina de huevo, cuando esta proteína es sometida a la acción del calor, con diferentes cantidades de agua. [1]

Albúmina de huevo + 50 % de agua, coagula a 56 °C

Albúmina de huevo + 25 % de agua, coagula entre 74 y 80 °C

Albúmina de huevo + 18 % de agua, coagula entre 80 y 90 °C

Albúmina de huevo + 6 % de agua, coagula a 145 °C

Albúmina de huevo sin agua, coagula entre 160 y 170 °C (temperaturas utilizadas habitualmente en esterilización por calor seco)

Las formas esporuladas de las bacterias Gram positivas, son los microorganismos más resistentes a la acción del calor seco, del mismo modo que se describió para el calor húmedo [3]

El mecanismo propuesto para explicar la inactivación microbiana por acción del calor seco es la oxidación de los componentes celulares. [1]

El tiempo y temperatura estándares mínimos recomendados para la esterilización por calor seco, son los equivalentes a la exposición efectiva del producto, durante 120 minutos a 160 °C [3]; o durante 60 minutos a 170 °C [1,3]

Principios físico–químicos en la esterilización por Calor húmedo

La razón de la extraordinaria eficacia de la esterilización por vapor de agua radica en la gran cantidad de energía almacenada en el vapor de agua saturado bajo la forma de calor latente. [1,3]

El calor latente de vaporización se define como la cantidad de calorías por unidad de masa que es necesario entregar a un fluido en fase líquida a su temperatura de ebullición, para lograr el cambio de estado a vapor saturado. En el caso del agua este valor es de 540 cal / g, a 100 °C.

Para describir cómo se produce el proceso de transferencia de calor del vapor de agua hacia los productos a esterilizar, tomemos como ejemplo la esterilización de una carga sólida porosa: eliminado previamente un elevado porcentaje del aire existente en la cámara y en el producto a esterilizar, el vapor de agua interactúa con los materiales transfiriéndoles calor principalmente por el mecanismo de convección. El vapor entra en contacto con el material a esterilizar que se encuentra a menor temperatura, cediendo su calor latente de vaporización y calentando el material. El material se humecta, así como los gérmenes contenidos en él, mientras que el vapor se condensa, manteniéndose el condensado producido a la misma temperatura que la del vapor saturado con el que se encuentra en equilibrio. En esas condiciones se produce una reducción instantánea del volumen y la presión local, que permite el pasaje de nuevas fracciones de vapor a través del material. Este proceso se produce infinitas veces a medida que el vapor penetra en el material a esterilizar, hasta lograrse el equilibrio de temperatura entre el ambiente reinante en la cámara del esterilizador y el material a procesar. [2]

Dos factores críticos a tener en cuenta en el desarrollo del proceso son: la remoción de aire de la cámara y de la carga y la calidad del vapor de agua. [1,3]

Remoción de aire:

La presencia de aire en la cámara de la autoclave es el principal factor que actúa en detrimento de la eficacia de la esterilización por vapor, ya que altera la relación presión / temperatura de la curva de equilibrio líquido–vapor[1,3]

Por ejemplo, a una presión de 2 Bar absolutos, el vapor saturado tiene una temperatura de 121 °C si ha sido removida previamente la totalidad del aire; por el contrario, si sólo se remueve un 50% del aire y otros gases no condensables, la temperatura resultante de la mezcla aire – vapor a la misma presión es de sólo 112 °C.

La presencia de aire en el interior del material a esterilizar, por la creación de zonas frías o "*cold spots*", puede provocar que sea insuficiente el tiempo de contacto de la carga con el vapor a la temperatura especificada, llegando a impedir la esterilización completa. [3]

Las técnicas utilizadas históricamente para remover el aire de la cámara son: [1]

- *Desplazamiento del aire por "flujo de masa del vapor":* Se desplaza el aire por efecto arrastre del flujo de vapor, obligando a la mezcla de gases a eliminarse por válvulas de escape ubicadas en la parte superior de la cámara. Éste es el mecanismo utilizado en las tradicionales autoclaves "Chamberland" utilizadas antiguamente en microbiología.
- *Desplazamiento por gravedad:* Basado en el principio de aprovechamiento de la densidad relativa del aire superior a la del vapor de agua (relación 3:1), con el efecto adicional del desplazamiento de masa por el flujo del vapor, que obliga al aire a eliminarse por válvulas de escape ubicadas en la parte inferior de la cámara.
- *Remoción por alto vacío*: Consiste en efectuar una única etapa de vacío profundo; se recomienda llegar hasta 20 mmHg antes de la admisión del vapor saturado. La utilización de esta metodología ha demostrado que causa: rotura de envoltorios herméticos, deshidratación en paquetes textiles y generación de sobrecalentamiento del vapor. Se produce un importante gasto de energía y desgaste de componentes al efectuar vacío profundo durante un tiempo prolongado.
- *Remoción por Vacío fraccionado, o sistema "pulsing":* Consiste en una secuencia de etapas / pulsos de vacío hasta un valor predeterminado, alternadas con etapas / pulsos de inyección de vapor saturado hasta una presión preestablecida. Tras cada pulso de vacío, la inyección de vapor a velocidad controlada actúa como diluyente del aire, evacuándose la mezcla resultante de aire y vapor en el pulso de vacío siguiente. Cuanto más profundo es el vacío durante la evacuación y más alta la presión en la inyección de vapor subsiguiente, mayor es la tasa de remoción de aire en cada pulso. Durante la fase de presión positiva, el vapor comprime el aire dentro del material y fluye a través él. En la etapa siguiente de evacuación a presión sub-atmosférica, el aire entrampado en la carga se expande, mientras que el vapor condensado dentro del paquete se re-evapora, empujando al aire fuera del paquete. Para la esterilización de cargas densas y porosas, puede requerirse la repetición de hasta 3 secuencias sucesivas de vacío e inyección de vapor a sobrepresión.
- *Sistema "pulsing" con desplazamiento por gravedad:* Una modificación del sistema "*pulsing*" consiste en adicionar en la etapa de remoción de aire, el efecto de desplazamiento por gravedad de la mezcla aire–vapor a través del sistema de evacuación del esterilizador. Para ello, a diferencia del sistema "*pulsing*" convencional, el nivel de vacío en cada pulso se mantiene unos instantes permitiendo que el vapor desplace por gravedad al aire, de mayor densidad. Este sistema demuestra ser la forma más efectiva para la remoción del aire, ya que introduce una mejora en el sistema "*pulsing*" tradicional al minimizar la re-entrada de aire durante las etapas de presurización con vapor.

Calidad del vapor: título y grado de sobrecalentamiento:

Se define como título de vapor a la masa porcentual de vapor saturado seco presente en una mezcla de vapor saturado seco, agua y gases no condensables [1]. Por ejemplo, si el título de vapor es de 97%, esto significa que contiene 3 partes en peso de agua en estado líquido y gases no condensables y 97 partes en peso de vapor saturado bajo el estado físico de vapor.

El límite aceptable es un título ≥ 95%, siendo lo ideal llegar a un 100% de vapor bajo la forma de vapor saturado[4]. El vapor húmedo (título inferior a 95 %) o sobresaturado es causal de humedad excesiva en los productos y/o en sus empaques, e interfiere con la penetración del vapor y la completa remoción del aire en el interior del paquete[1]. Las principales causas de este fenómeno son el flujo de ingreso del vapor a cámara a gran velocidad, produciendo

condensación en la pared de tuberías; y un sistema deficiente de eliminación de condensado en la línea de vapor desde su generación al punto de uso. [1,3]

El grado de sobrecalentamiento del vapor de agua es el número de grados centígrados en exceso respecto de la temperatura del vapor saturado seco a la misma presión [1]. El vapor de agua sobrecalentado se comporta como cualquier mezcla de gases. En contacto con una superficie más fría que la temperatura que corresponde al equilibrio líquido – vapor para esa presión de trabajo, el vapor sobrecalentado disminuye su temperatura adicional y se comporta como aire caliente, a diferencia del vapor saturado, que cede su calor a temperatura constante [3]. Recién cuando la temperatura del vapor disminuye hasta el punto de condensación, se produce el cambio de estado y el intercambio térmico deseado con los productos a esterilizar. [3]

Aunque un sobrecalentamiento de hasta 5 °C de exceso puede tolerarse sin inconvenientes, está comprobado que niveles superiores a ese límite producen una importante disminución en la velocidad de destrucción de esporulados (Walter, 1948; Savage, 1937)

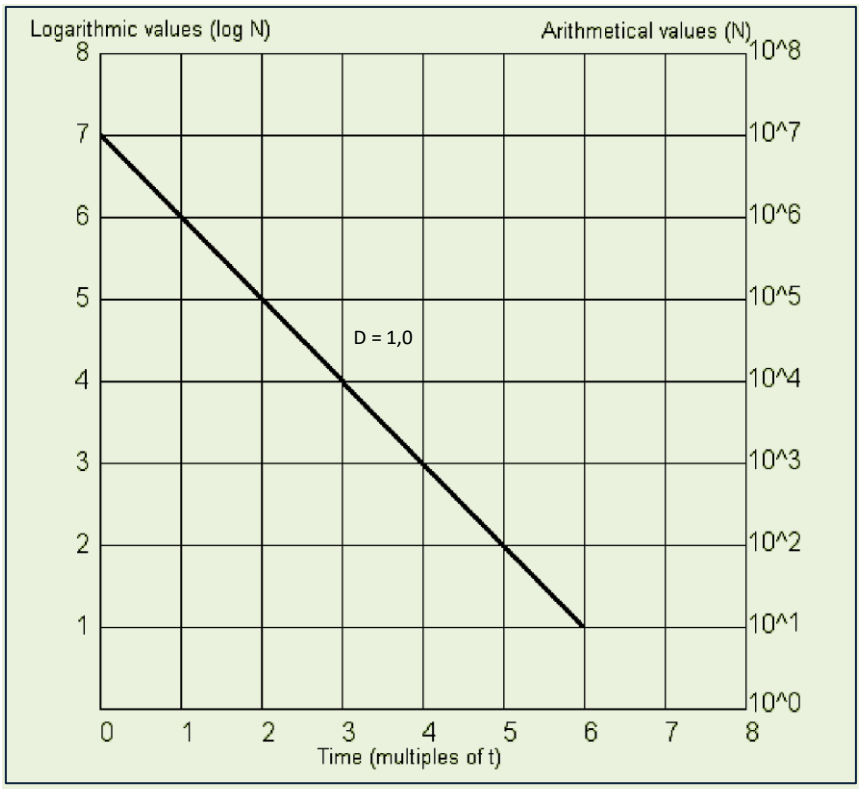
La principal causa del sobrecalentamiento es la reducción brusca de la presión cuando el vapor es conducido en la línea de vapor hasta el punto de uso por medio de válvulas reductoras, a temperatura constante, por lo que se altera la relación de equilibrio presión – temperatura. [1]

Variables termodinámicas de la esterilización por calor

La degradación de los microorganismos por acción del calor responde a una cinética de reacción de primer orden [1,2,3], tal como se explicó en el Capítulo II.2 – Esterilización: Generalidades. De acuerdo a esta cinética, los microorganismos mueren en progresión geométrica, es decir, en intervalos iguales y sucesivos de tiempo de exposición a temperatura constante, se destruye un mismo porcentaje de los microorganismos que resta degradar.

El Gráfico 1 muestra cómo la concentración de microorganismos viables N existentes al comienzo del proceso desciende exponencialmente con el tiempo de exposición al calor.

***Gráfico 1**: Cinética de muerte microbiana por acción del calor a una determinada temperatura (escala semilogarítmica)*



Para que sea posible evaluar la capacidad de destrucción térmica de un proceso de esterilización, se utilizan las siguientes variables:

Valor D: tiempo de exposición a temperatura constante, necesario para inactivar el 90% de una población microbiana

Valor z: diferencia de temperatura, necesaria para modificar el valor D por un factor de 10

Valor F: medida de letalidad o efecto esterilizante de un proceso específico

El uso de los valores D, z y F permite comparar la efectividad de diferentes procesos de esterilización utilizando un modelo matemático.

Valor D – Tiempo de Reducción Decimal

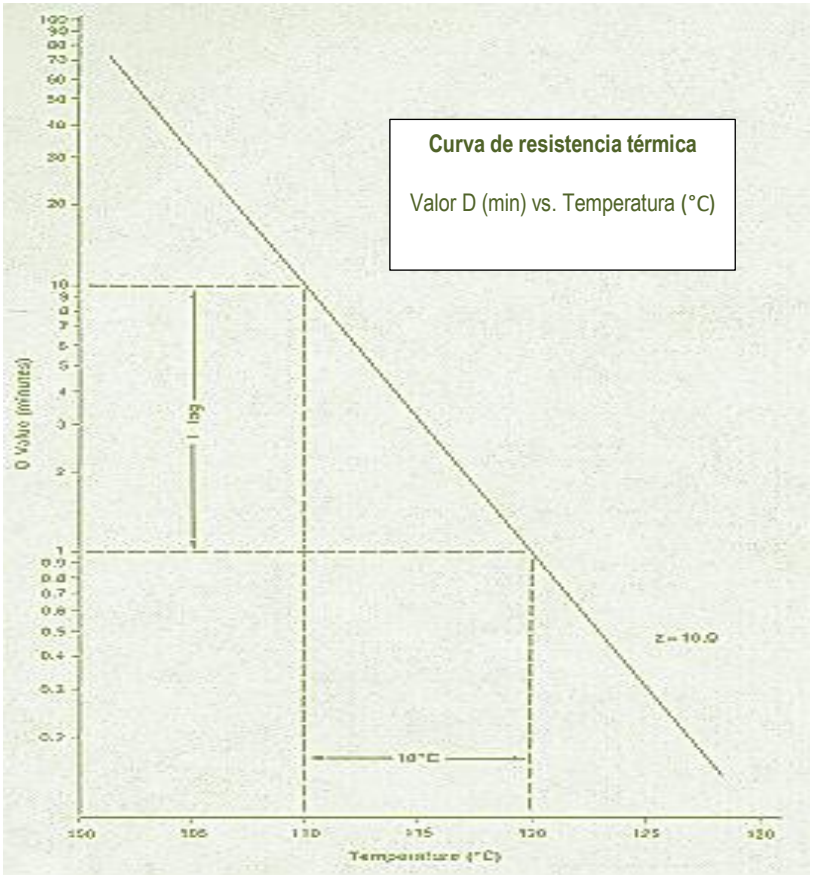
D es el tiempo necesario para reducir en 1 logaritmo una población microbiana específica, considerando que el proceso se desarrolla a una temperatura específica constante T

El valor D en la esterilización por calor depende de cada especie de microorganismo y de su resistencia a la temperatura T. El valor D se expresa en minutos.

Valor z – Coeficiente de Temperatura de Destrucción

El valor z es la diferencia de temperatura necesaria para causar una variación de 1 logaritmo en el valor D. El valor z se expresa en °C. También se lo puede expresar como el cambio de temperatura en ^{0} C necesario para modificar el valor D por un factor de 10.

Gráfico 2: *Curva de resistencia térmica en función de la temperatura del proceso (escala semilogarítmica)*



Valores D y z habitualmente utilizados

En la esterilización por vapor de agua a 121 °C, el valor D para diferentes microorganismos oscila entre 0,2 y 2 minutos. Habitualmente se utiliza un D_{121} = 1 min, considerado un valor promedio real para los microorganismos vegetativos, así como habitualmente se asume z como variable termodinámica = 10 °C, a falta de datos más precisos [1,3]. Estos son los parámetros utilizados en los modelos matemáticos en la esterilización por calor húmedo, sin embargo, los cultivos preparados con los bio-indicadores de referencia para los procesos de esterilización por calor tienen valores D y z definidos en normas [5,6]

Para el microorganismo esporulado de referencia de calor húmedo, el *Geobacillus stearotermophillus,* el valor de D a 121 °C es ≥ 1,5 minutos, mientras que el valor z ≥ 6 °C [5]

En la esterilización por calor seco a 160 °C, el valor D para el microorganismo esporulado de referencia, *Bacillus atrophaeus*, el valor D debe ser ≥ 2,5 minutos y el valor z ≥ 20 °C [6]

Valor F: Letalidad o Punto de muerte térmica

En los procesos de esterilización por calor nos interesa integrar el efecto letal dentro del rango de temperaturas y tiempo en que se desarrolla el proceso; así como determinar letalidades equivalentes a distintas temperaturas de proceso. Para resolver este tipo de problemas se utiliza la variable matemática F, o Punto de muerte térmica.

Si relacionamos un microorganismo hipotético con los tiempos de muerte térmica para cada temperatura de exposición, obtendremos una recta de pendiente negativa, definida por la siguiente ecuación matemática:

$$\text{Log } F_{Tx} = 1/z\ (T_r - T_x) + \text{Log } F_{Tr}$$

donde: F_{Tx} = Tiempo de muerte térmica a la temperatura X (proceso real)
F_{Tr} = Tiempo de muerte térmica a la temperatura de referencia
T_x = Temperatura correspondiente a F_{Tx} (proceso real)
T_r = Temperatura de referencia

Si relacionamos el tiempo de muerte térmica a la temperatura de referencia para el calor húmedo (121 °C) con el correspondiente a otra temperatura X, tendremos:

$$FTr / FTx = 10^{(Tx - 121)/Z} = \text{L: Letalidad}$$

(donde z= se toma por convención como 10 °C)

Cuando asumimos una temperatura de referencia T_r igual a 121 °C, la letalidad calculada se denomina F_0 o F_{121}

La Letalidad Instantánea IF_0 representa entonces el tiempo equivalente a 121 °C (T_r), que produce el mismo efecto letal que la exposición durante 1 minuto a la temperatura real del proceso (T_x).

El tiempo equivalente de exposición a 121 °C para todo el proceso, que atravesará distintas temperaturas en cada intervalo de tiempo, se define como Letalidad Acumulada AF_0 por la carga en el tiempo. El valor AF_0 es entonces el tiempo de exposición equivalente, expresado en minutos a 121 °C, (proceso ideal) que corresponde a la exposición a temperatura variable (proceso real), calculado para un microorganismo hipotético con coeficientes D = 1 min. y z = 10 °C

$$Fo: \int L.\ dt$$

Tomando intervalos finitos de tiempo, esta integral se puede representar también por la ecuación:

$$Fo: \sum L.\ \Delta t$$

Esta fórmula es la que utilizan los esterilizadores por vapor y los instrumentos de validación externos a la autoclave para realizar el cálculo de esta variable matemática, F_0 durante la ejecución de los ciclos de esterilización.

La Tabla 1 muestra valores típicos de F_0 a distintas temperaturas.

El cálculo de la letalidad o tiempo equivalente a una exposición a 121 °C, es especialmente útil en la validación y control de ciclos de esterilización a temperaturas de 121 °C o inferiores, utilizadas habitualmente en la industria farmacéutica, ya que permite con certeza conocer cuál fue la letalidad alcanzada por el proceso de esterilización para cada carga.

Por el contrario, su relevancia es mínima en ciclos a 134 °C, temperaturas habituales de trabajo para la esterilización de cargas mixtas termo-resistentes procesadas en instituciones de salud, ya que su valor, aún para ciclos cortos de 4 minutos de exposición, siempre supera el criterio de aceptación habitual de F_0 en el punto de menor temperatura (F_0 mínimo). Como se puede observar en la Tabla 1, sólo 1 minuto de exposición a 134 °C tiene una letalidad equivalente a casi 20 minutos a 121 °C.

Tabla 1: *Letalidades equivalentes a diferentes temperaturas de esterilizado*

Temperatura referencia Tr	121	ºC		
valor Z	10	ºC		
Temperatura de Proceso (ºC)	Letalidad F0 (minutos)			
	+ 0,0	+ 0,2	+ 0,4	+ 0,6	+ 0,8
100	0,008	0,008	0,009	0,009	0,010
101	**0,010**	**0,010**	**0,011**	**0,011**	**0,012**
102	0,013	0,013	0,014	0,014	0,015
103	0,016	0,017	0,017	0,018	0,019
104	0,020	0,021	0,022	0,023	0,024
105	0,025	0,026	0,028	0,029	0,030
106	0,032	0,033	0,035	0,036	0,038
107	0,040	0,042	0,044	0,046	0,048
108	0,050	0,052	0,055	0,058	0,060
109	0,063	0,066	0,069	0,072	0,076
110	0,079	0,083	0,087	0,091	0,095
111	**0,100**	**0,105**	**0,110**	**0,115**	**0,120**
112	0,126	0,132	0,138	0,145	0,151
113	0,158	0,166	0,174	0,182	0,191
114	0,200	0,209	0,219	0,229	0,240
115	0,251	0,263	0,275	0,288	0,302
116	0,316	0,331	0,347	0,363	0,380
117	0,398	0,417	0,437	0,457	0,479
118	0,501	0,525	0,550	0,575	0,603
119	0,631	0,661	0,692	0,724	0,759
120	0,794	0,832	0,871	0,912	0,955
121	**1,00**	**1,05**	**1,10**	**1,15**	**1,20**
122	1,26	1,32	1,38	1,45	1,51
123	1,58	1,66	1,74	1,82	1,91
124	2,00	2,09	2,19	2,29	2,40
125	2,51	2,63	2,75	2,88	3,02
126	3,16	3,31	3,47	3,63	3,80
127	3,98	4,17	4,37	4,57	4,79
128	5,01	5,25	5,50	5,75	6,03
129	6,31	6,61	6,92	7,24	7,59
130	7,94	8,32	8,71	9,12	9,55
131	**10,00**	**10,47**	**10,96**	**11,48**	**12,02**
132	12,59	13,18	13,80	14,45	15,14
133	15,85	16,60	17,38	18,20	19,05
134	19,95	20,89	21,88	22,91	23,99
135	25,12	26,30	27,54	28,84	30,20

El concepto de F también es aplicable a los procesos de esterilización por calor seco, aunque su utilidad es limitada[3]. En este caso se define la variable F_H para describir la letalidad del proceso en términos de número equivalente de minutos a 170 °C.

Al igual que para los procesos por calor húmedo, el valor F_H es entonces el tiempo de exposición equivalente, expresado en minutos a 170 °C (proceso ideal) que corresponde a la exposición a temperatura variable (proceso real), calculado para un microorganismo específico con un coeficiente de temperatura Z = 20 °C [3]

$$F_H: \int L.\, dt$$

Tomando intervalos finitos de tiempo, esta integral se puede representar también por la ecuación:

$$F_H: \sum L.\, \Delta t$$

Esterilizadores por calor húmedo

El equipamiento para este método de esterilización se presenta en una variedad importante de tamaños, diseños y variantes de tecnología, dependiendo del uso al que está destinado (esterilización de soluciones parenterales, insumos hospitalarios, materiales y medios de cultivo para laboratorio de microbiología, etc) [1]

Podemos clasificar los esterilizadores disponibles en los siguientes grupos:

- *Autoclaves por Vapor de Agua saturado seco, para materiales en general. Son equipos con capacidad de cámara entre 150 y 1500 litros habitualmente*
- *Autoclaves de Mesada, para instrumental de pequeñas dimensiones. Capacidad de cámara de 20 a 30 litros habitualmente*
- *Autoclaves por Cascada de Agua Sobrecalentada con Presión Compensada, para soluciones parenterales en envases flexibles. Son equipos de gran capacidad de cámara, entre 3 y 20 metros cúbicos habitualmente*
- *Autoclaves por Mezcla de Aire y Vapor de Agua, para soluciones parenterales en envases flexibles*

Describiremos los lineamientos generales constructivos de una autoclave del tipo “multipropósito”, cuyo esquema se resume en la Figura 1, diseñado para esterilizar con diferentes programas cargas sólidas porosas y/o no porosas; así como cargas líquidas en envases rígidos.

Estructura: básicamente una autoclave consiste en una cámara hermética construida en acero, de forma cuadrangular o cilíndrica, dispuesta horizontal o verticalmente.

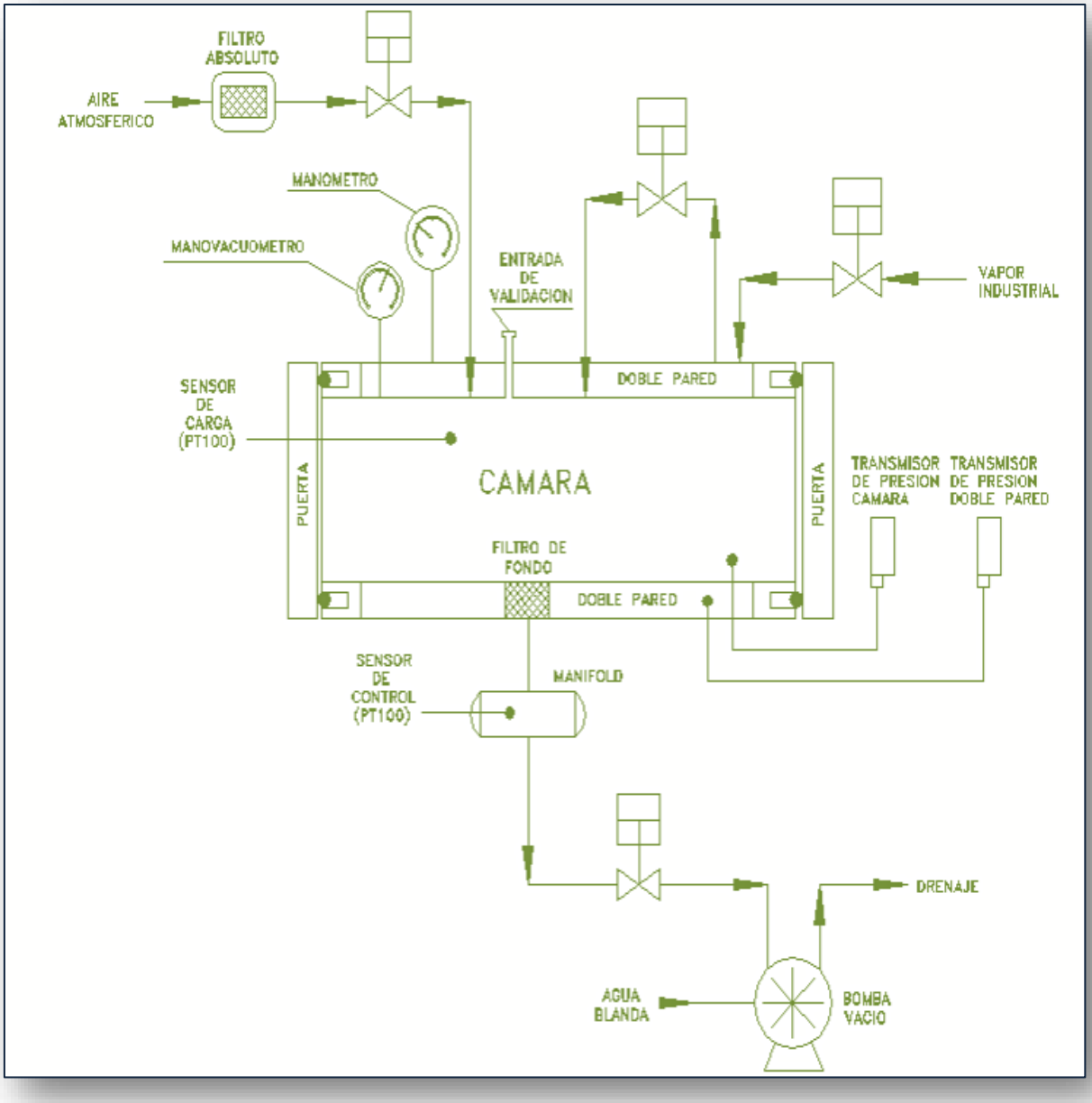
La cámara puede estar equipada con sólo una puerta para carga y descarga de materiales o bien con dos puertas ubicadas en las áreas anterior o de carga y posterior o de descarga de materiales. La cantidad de puertas dependerá de si el esterilizador comunica dos áreas contiguas a modo de esclusa o no.

Cada puerta posee un mecanismo que permite su sellado hermético a la cámara e impide su apertura durante el proceso y en condiciones no seguras (vacío o presión). En los equipos de dos puertas este mecanismo también impide la apertura simultánea de las mismas en todo momento, para evitar la comunicación de dos áreas con diferentes requisitos ambientales.

Una chaqueta o camisa construida en acero cubre externamente toda o parte de la superficie de la cámara interna, con excepción de las puertas y la parte posterior del equipo en caso de equipos de una puerta. La chaqueta o camisa permite mediante vapor de agua a presión, mantener a temperatura la cámara aun con la puerta abierta y en aquellas etapas con vacío en cámara. [1]

Otro elemento adicional es el separador o baffle deflector del vapor ingresante. El deflector impide que la carga a esterilizar sea mojada por condensado y agua que arrastra el vapor que ingresan a cámara, desviando el agua hacia el drenaje. [1]

Figura 1: *Diagrama de Autoclave multipropósito con conexiones a instrumentos y tuberías*



Calefacción: tanto la cámara interna como la camisa son calefaccionadas por vapor de agua, que puede ser suministrado por un generador / caldera incorporado al esterilizador o externo, alimentado por electricidad, gas, o combustible líquido.

Automatismo: la secuencia de etapas del proceso de esterilización como cada variable de etapa (condiciones necesarias para iniciar un ciclo, ingreso de vapor, eliminación de aire y condensado, mantenimiento de las diferentes presiones y temperaturas de trabajo, alarmas por falta de suministros o fallas de componentes, etc.), son controladas por medio de un automatismo. El automatismo incluye entre otras cosas un controlador micro-procesado que recibe información del estado del equipo / proceso desde los diferentes instrumentos de medición (transmisores de presión, sensores de temperatura, presostatos, termostatos, sensores de posición, etc.).

Con esta información y un software específico, el controlador comanda las diferentes válvulas y bombas actuadas de acuerdo a cada etapa que compone el proceso.

Normalmente los esterilizadores poseen dos sensores de temperatura; uno localizado fijo en la línea de drenaje de condensado de cámara (representativo del punto frío de la cámara) y otro libre en el interior de la cámara (para insertar en un punto representativo de la carga). Los ciclos de esterilización de materiales sólidos porosos y no porosos deben ser comandados por el sensor de cámara; mientras que los ciclos de líquidos – principalmente

volúmenes medianos y grandes, superiores a 50 o 100 ml. – deben ser comandados por el sensor de carga. El mismo debe ser colocado manualmente (sumergido en el líquido) dentro de la carga.

En esterilizadores que permiten realizar secado final de la carga por vacío, la restitución de la presión atmosférica de la cámara se efectúa mediante ingreso de aire atmosférico a través de la válvula de aireación y un filtro HEPA, que impide la re-contaminación del material esterilizado. [3,4]

Algunos esterilizadores incorporan dispositivos detectores de aire residual, portátiles o fijos conectados a un punto crítico de la cámara del esterilizador, por ejemplo el manifold [4,7,8]. Su funcionamiento y utilidad se basan en la medición termométrica, al final de la etapa de remoción de aire de la cámara y antes del comienzo de la meseta de esterilizado, de la diferencia entre la temperatura de cámara y aquella leída por un sensor de temperatura ubicado dentro del detector de aire, que consiste en un dispositivo intrincado en el que se entrampa el aire. De este modo, una disminución de la temperatura del vapor detectada en el interior del dispositivo igual o superior a 2 °C respecto de la temperatura de referencia del proceso, se correlaciona con la presencia de aire o gases no condensables que podrían acumularse en la carga de esterilización, por ejemplo, en lúmenes, y producir un fallo del proceso no detectable de otra manera. [4,8]. El detector emite en este caso una alarma visual y/o sonora de la falla.[4]
Para que la utilización de estos dispositivos sea efectiva, es crucial su correcta calibración previa y la realización de ensayos periódicos de efectividad de funcionamiento, con cargas de referencia estipuladas en normas [4,7]

Seguridad: la cámara interna, la camisa y eventualmente el generador de vapor, poseen sistemas electrónicos y lógicos que mantienen las presiones dentro del rango seguro. Si los mismos fallaran, también están equipadas con válvulas de seguridad y alivio que actúan en caso de sobrepasarse la presión máxima permitida.

Los servicios o suministros conectados al esterilizador por vapor comprenden habitualmente:

- Electricidad – Fuerza motriz, en formato 3 x 220 / 380 VCA x 50 / 60 Hz con Neutro y Tierra
- Vapor de Agua, libre de condensado y partículas, cuando el esterilizador no posee su propio generador de vapor. Es recomendable instalar purgadores y/o separadores de gota y filtros al ingreso del vapor a cámara [1,4]
- Agua Purificada, para alimentar el generador de vapor. [4]
- Agua Potable Blanda, a temperatura ambiente, para alimentar la bomba de vacío [4]
- Aire Comprimido, libre de agua, aceite y partículas, cuando el esterilizador incluye válvulas actuadas neumáticamente y no posea su propio compresor de aire [4]
- Conexión a nivel de la base del esterilizador, para drenaje / desagüe de condensados. La tubería debe ser abierta, no ofrecer contrapresión y ser resistente a 99 °C
- Conexión a nivel del techo del esterilizador, para venteo de gases no condensables. La tubería debe ser abierta, no ofrecer contrapresión y ser resistente a 99 °C

Los esterilizadores deben contar con un registrador alfanumérico o gráfico de los parámetros del proceso. [4,9,10]

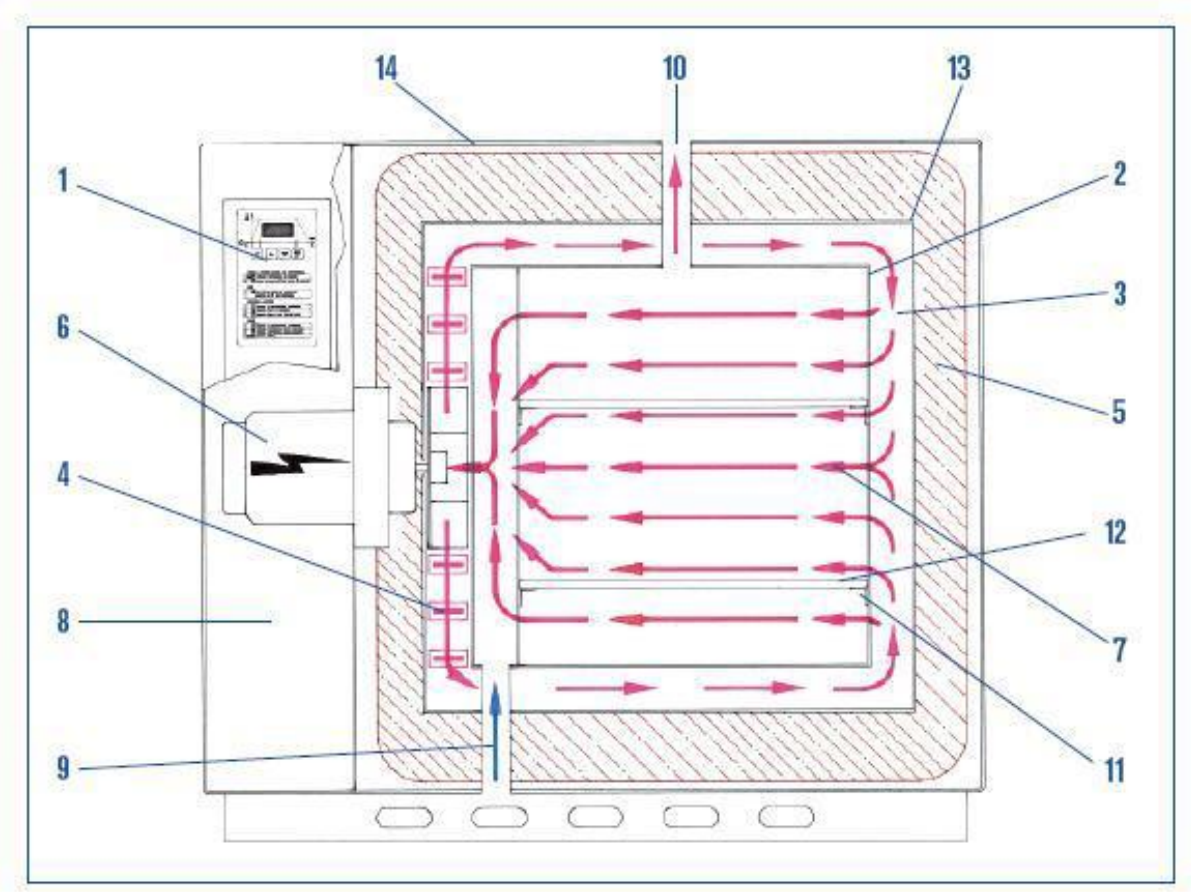
Esterilizadores por calor seco

Para la esterilización por calor seco se utiliza como equipamiento esterilizador una estufa en la que circula en forma homogénea aire caliente, cuyo esquema se muestra en la Figura 2.
La eficacia de la esterilización depende de la transferencia del calor por acción de aire caliente hacia los materiales más fríos ubicados sobre los estantes cribados; para lograr este objetivo es esencial una distribución uniforme de la temperatura a través de la cámara. Esto se logra por medio de un ventilador o forzador del aire ubicado generalmente en la parte trasera del esterilizador, facilitando la convección y evitando estratificación del aire [3].

Como guía para los requisitos de características constructivas, instrumentos de control, de medición y de seguridad que deben contar estos esterilizadores se puede consultar la Norma IRAM vigente en nuestro país [11].

Estructura: Básicamente el esterilizador consiste en una cámara en acero inoxidable calidad 304, con junta de caucho siliconado en cierre de puerta. Internamente debe contar con estantes perforados de altura regulable para facilitar la circulación del aire caliente en forma homogénea, construidos también en acero inoxidable 304.
Debe existir una toma de aire exterior, así como una salida de aire para vapores ubicada en la parte superior de la estufa. Pueden ser de una puerta o de doble puerta, y cada puerta constituida por una o dos hojas, rebatibles.
Debe contar con una entrada para validación con brida y cierre hermético a través de una tapa roscada o bridada.
La cámara o recinto interno debe estar aislada del exterior por medio de una camisa externa; el material aislante entre la cámara de esterilización, adosado a ésta y a la camisa externa suele fabricarse con fibra mineral.

Figura 2: *Diagrama de una Estufa de convección forzada para esterilización con sus partes constitutivas*



Referencias Figura 2:

1. Regulador por microprocesador y lector digital de temperatura y del programador horario que permite seleccionar los periodos de tiempo preestablecidos con sensor de la temperatura con sonda Pt 100.
2. Cámara del esterilizador o recinto útil, en acero inoxidable AISI 304.
3. Cámara externa de precalentamiento en acero inoxidable AISI 304.
4. Elementos calefactores blindados, distribuidos homogéneamente y montados al aire.
5. Aislamiento térmico adosado en las paredes de la cámara para limitar la temperatura externa del mueble.
6. Grupo motor ventilador para la circulación forzada de aire.
7. Esquema del sistema de la circulación forzada del aire que se proyecta homogéneamente desde la cámara de precalentamiento, donde están situados los elementos calefactores, al recinto interior de la cubeta útil.
8. Cámara independiente para los elementos de regulación y control.
9. Admisión de aire exterior.
10. Dispositivo de aireación con salida regulable de 120mm Ø.
11. Guías soporte bandejas.
12. Bandejas en acero inoxidable AISI 304.
13. Junta de silicona flexible adosada en la entrada de la cubeta interior.
14. Mueble exterior recubierto generalmente de resina epoxi.

Automatismo: Todas las etapas, así como el mantenimiento de la temperatura de trabajo y los tiempos, son controladas por medio de un automatismo. Como se trata de un proceso simple, el automatismo puede ser electromecánico o micro-procesado a través de software específico. El automatismo comanda los diferentes actuadores de calefactores, motores y temporizadores, de acuerdo a las etapas que componen el proceso.

Calefacción: Debe contar con resistencias calefactoras distribuidas homogéneamente en la cámara. La distribución homogénea de temperatura se logra por medio de un forzador (ventilador) acoplado a un motor eléctrico normalizado, que evitan la estratificación del aire. Los calefactores deben contar con una tapa removible para su inspección, limpieza y eventual reemplazo. El tiempo máximo para lograr 160 °C en la posición de medición de referencia no debe superar los 50 minutos [11]. La máxima diferencia de temperaturas una vez transcurridos los primeros 50 minutos de tiempo de esterilizado, que se pueden obtener dentro de la cámara del esterilizador funcionando a cámara vacía no deberán superar los (160±2) °C; (170±3) °C o (180±4) °C, dependiendo de la temperatura de esterilización establecida [11].

Instrumentos de control y elementos de seguridad: El esterilizador debe poseer protección eléctrica por corto circuito y descarga a tierra. Como instrumento de control debe poseer un termostato electrónico con indicación de temperatura en display 0-250 °C, y un temporizador electrónico o electromecánico. Debe estar provisto de un termostato calibrado a 210 °C actuando como instrumento de seguridad en caso de sobrepasarse la temperatura máxima permitida. El sensor de temperatura, generalmente del tipo PT100, debe estar instalado en una posición de referencia, que debe ser el punto más frío de la cámara. Debe estar provisto de un registrador gráfico o alfanumérico Temperatura vs. Tiempo.
Los servicios o suministros conectados al esterilizador por calor seco comprenden habitualmente:

- Electricidad – Fuerza motriz, en formato 3 x 220 / 380 VCA x 50 / 60 Hz con Neutro y Tierra
- Conexión a nivel del techo del esterilizador, para venteo de vapores. La tubería debe ser abierta, no ofrecer contrapresión y ser resistente a 99 °C

Proceso de esterilización por calor húmedo

Para describir las etapas de ciclos estándar utilizados en la esterilización por calor húmedo, debemos distinguir dos principios de funcionamiento y desarrollo del proceso de esterilización por calor húmedo, totalmente diferentes:

A) Esterilización por Vapor de Agua saturado seco.
B) Esterilización por sistema de Presión Compensada – Cascada de Agua o Mezcla de Aire y Vapor.

A) Esterilización por vapor saturado seco:
En este caso el agente esterilizante es el vapor saturado seco, que toma contacto íntimo con los productos a esterilizar.
En la esterilización con vapor saturado, se debe especificar para cada etapa, los parámetros y rangos permitidos para cada variable física para cada familia de productos y/o configuración de carga presentada para su esterilización.[7,8]
El concepto de "familia de productos" en la esterilización por vapor saturado se refiere a grupos o subgrupos de productos médicos que presentan similares características de masa, material constitutivo, presencia de lúmenes y sistema de envasado, de modo de conformar un desafío similar al proceso de esterilización [7]

De acuerdo al sistema utilizado para lograr la remoción de aire de la cámara y de la carga, ya sea por remoción forzada de aire o por desplazamiento por gravedad, varía la tecnología empleada y la secuencia de los ciclos.[8,10]

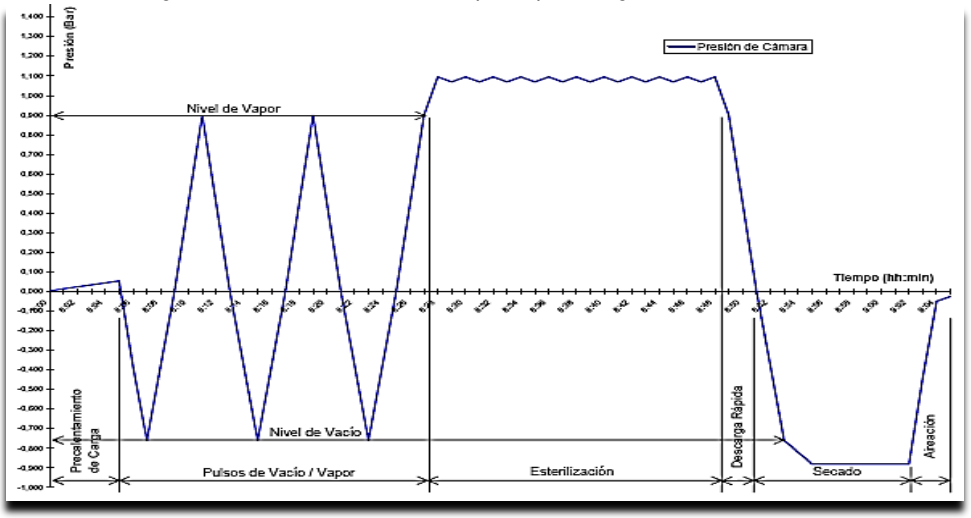
A.1) CICLO DE ESTERILIZACIÓN POR VAPOR DE AGUA CON REMOCIÓN FORZADA DEL AIRE:

Ver en la Tabla 2 la descripción del ciclo. Ver en el Gráfico 3 el diagrama del ciclo:

Tabla 2. *Descripción del ciclo de esterilización por vapor de agua con remoción forzada del aire*

Etapa	Objetivo y descripción de etapa	Variables de etapa
Stand-by	Precalentar la cámara del esterilizador hasta alcanzar la temperatura de trabajo. Cargar el material a esterilizar, cerrar y bloquear la puerta. Seleccionar e iniciar el programa de esterilización adecuado.	Presión / temperatura de camisa de calefacción. Posibilidad de abrir la puerta de carga.
Pulso de vacío	Extraer el aire y el condensado existentes en la cámara y carga. Se accionan la bomba y la válvula de vacío de cámara, la presión de cámara desciende hasta alcanzar el nivel de vacío predefinido.	Nivel de vacío Cantidad de pulsos
Pulso de vapor	Arrastrar el aire y el condensado existentes en la cámara y carga. Precalentar el material a esterilizar. Se acciona la válvula de vapor a cámara, la presión de cámara asciende hasta alcanzar el valor predefinido.	Presión de vapor Cantidad de pulsos
Esterilizado	Calentar el material a esterilizar hasta la temperatura de esterilización predefinida y mantener esta temperatura durante el tiempo predefinido. Se acciona en forma intermitente la válvula de vapor a cámara, la presión de cámara se mantiene en el valor predefinido.	Sensor en cámara o carga Control por tiempo o Fo Temperatura de esterilizado Tiempo de esterilizado
Descarga rápida	Desalojar el vapor y el condensado existentes en la cámara. Se acciona la válvula de descarga de cámara, la presión de cámara desciende hasta alcanzar la presión atmosférica.	Descarga rápida Presión de cámara = atmosférica
Secado	Extraer el condensado y humedad existentes en la cámara, la presión de cámara desciende por debajo de la atmosférica hasta un valor preestablecido.	Nivel de vacío Tiempo de secado
Aireación	Romper el vacío de cámara. Se acciona la válvula de aireación de cámara, la presión de cámara asciende hasta alcanzar la presión atmosférica.	Presión de cámara = atmosférica
Fin de ciclo	Descargar el material esterilizado.	

Gráfico 3: *Diagrama del ciclo de esterilización por vapor de agua con remoción forzada del aire*



Aplicación:
En la esterilización de cargas sólidas porosas y no porosas; dispositivos con lúmenes y cavidades internas, productos envueltos. Los parámetros recomendados para las variables del proceso utilizando esta tecnología son de 4 minutos de esterilizado a 134 °C, y 15 a 20 minutos de esterilizado a 121 °C. [1,2,7,8,10]

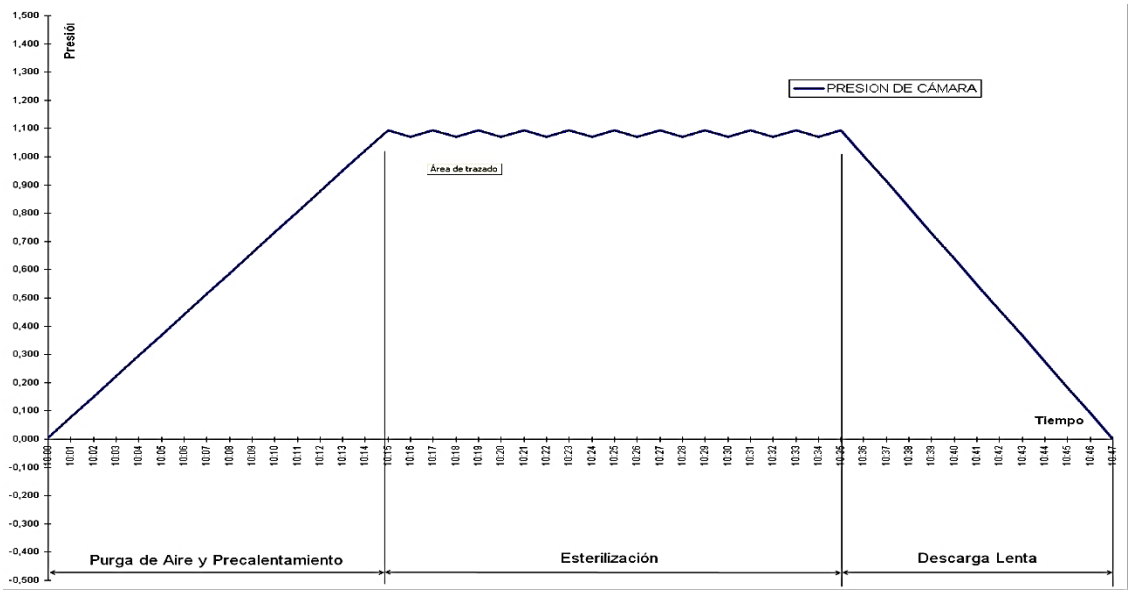
A.2) CICLO DE ESTERILIZACIÓN POR VAPOR DE AGUA CON REMOCIÓN GRAVITACIONAL DEL AIRE:

Ver en la Tabla 3 la descripción del ciclo. Ver en el Gráfico 4 el diagrama del ciclo:

Tabla 3. *Descripción del ciclo de esterilización por vapor de agua con remoción gravitacional del aire*

Etapa	Descripción de etapa	Variables de etapa
Stand-by	Idem ciclo con remoción forzada de aire	
Purga de aire y precalentamiento	Arrastrar el aire y el condensado existentes en la cámara y carga. Precalentar el material a esterilizar. Se acciona la válvula de vapor a cámara, la presión de cámara asciende hasta alcanzar el valor predefinido.	Presión de vapor
		Temperatura de precalentamiento
Esterilizado	Calentar el material a esterilizar hasta la temperatura de esterilización predefinida y mantener esta temperatura durante el tiempo predefinido. Se acciona en forma intermitente la válvula de vapor a cámara, la presión de cámara se mantiene en el valor predefinido.	Sensor de cámara o carga
		Control por tiempo o por Fo
		Temperatura de esterilizado
		Tiempo de esterilizado
Descarga lenta	Desalojar el vapor y el condensado existentes en la cámara. El vapor y el condensado escapan por la purga, la presión de cámara desciende hasta alcanzar la presión atmosférica.	Descarga lenta
		Presión de cámara = atmosférica
Fin de ciclo	Ídem ciclo con remoción forzada de aire	

Gráfico 4: *Diagrama del ciclo de esterilización por vapor de agua con remoción gravitacional del aire*



Aplicación

En la esterilización de soluciones parenterales en contenedores rígidos, tales como viales de vidrio borosilicato con sello precintado de goma. Los parámetros recomendados son una temperatura de 121 °C durante un tiempo de exposición efectivo mínimo de 15 minutos. [3]

También es aplicable a cargas sólidas no porosas; en este caso los parámetros recomendados para cargas sólidas envueltas son 15 minutos de esterilizado a 134 ° C, y 30 minutos de esterilizado a 121 ^{0}C. [1,2,7,8,10]

B) Esterilización por sistema de presión compensada:

Este sistema es empleado para esterilizar productos líquidos en contenedores flexibles, principalmente soluciones parenterales, utilizando una sobrepresión en cámara respecto del interior del envase; esto se logra mediante inyección de aire filtrado y calefaccionado, en los métodos de mezcla de aire y cascada de agua.

El motivo principal de sobrepresurizar la cámara es la de contener los envases flexibles, evitando la deformación o rotura de los mismos, ya que en ciertas etapas del ciclo la presión en el interior del envase supera la presión de cámara.

En estos procesos, ni el agua, ni el vapor de agua, ni el aire, toman contacto directo con el producto, sino que sólo actúan como medio calefactor a través de las paredes del recipiente, produciéndose la esterilización del producto "*in situ*" en el seno del líquido acuoso [7,8]

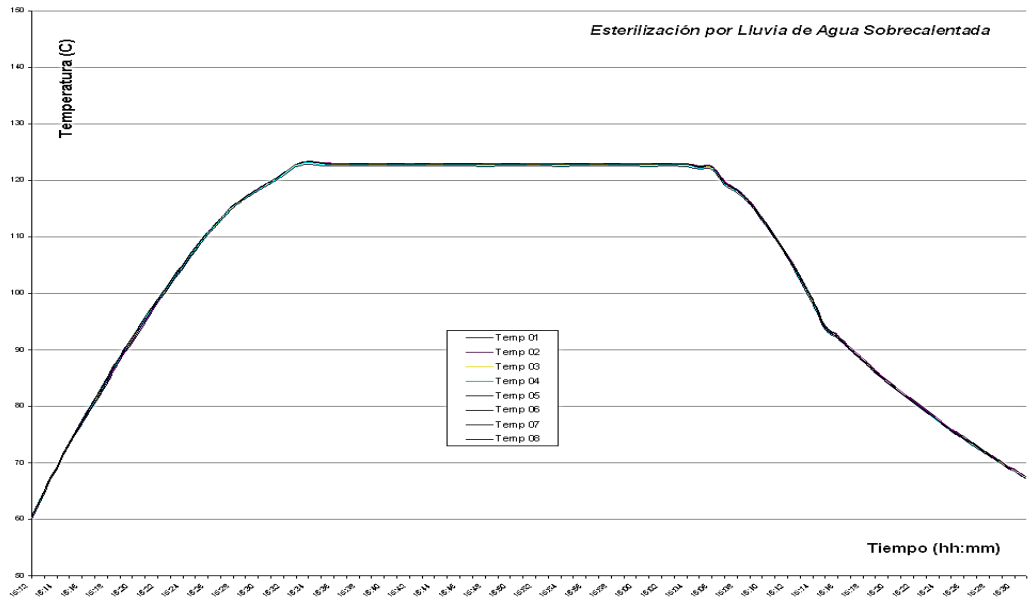
CICLO DE ESTERILIZACIÓN POR CASCADA DE AGUA SOBRECALENTADA, CON PRESIÓN COMPENSADA:

Ver en la Tabla 4 la descripción del ciclo. Ver en el Gráfico 5 el diagrama del ciclo.

Tabla 4. *Descripción del ciclo de esterilización por lluvia de agua sobrecalentada con presión compensada*

Etapa	Objetivo y descripción de etapa	Variables de etapa
Stand-by	Cargar el material a esterilizar, cerrar y bloquear la puerta. Seleccionar e iniciar el programa de esterilización adecuado.	Posibilidad de abrir la puerta de carga.
Carga de Agua	Cargar en la cámara la cantidad de agua necesaria para el desarrollo del ciclo. Se acciona la válvula de carga de agua a la cámara, el nivel de agua en la cámara asciende hasta alcanzar el valor predefinido.	Nivel de agua en cámara
Precalenta-Miento	Precalentar el material a esterilizar. Se accionan la bomba de recirculación y la válvula de calefacción de agua en cámara (vapor a intercambiador de calor), la temperatura de cámara asciende hasta alcanzar el valor predefinido.	Temperatura de precalentamiento Presión compensada
Esterilizado	Calentar el material a esterilizar hasta la temperatura de esterilización predefinida y mantener esta temperatura durante el tiempo predefinido. Se mantiene accionada la bomba de recirculación de agua en cámara. Se acciona en forma intermitente la válvula de calefacción, la temperatura de cámara se mantiene en el valor predefinido.	Temperatura de esterilizado Tiempo de esterilizado Presión compensada
Enfriamiento	Enfriar el material esterilizado. Se mantiene accionada la bomba de recirculación de agua en cámara. Se acciona la válvula de enfriamiento de agua en cámara (agua fría a intercambiador de calor), la temperatura de cámara desciende hasta el vapor predefinido.	Temperatura de enfriamiento Presión compensada.
Descarga de agua	Descargar de la cámara la cantidad de agua necesaria para finalizar el ciclo. Se acciona la válvula de descarga de agua de la cámara, el nivel de agua en cámara desciende hasta alcanzar el valor predefinido.	Nivel de agua
Descarga de presión	Descargar la presión de agua y vapor existentes en la cámara. Se acciona la válvula de venteo de cámara, la presión de cámara desciende hasta alcanzar la presión atmosférica.	Presión de cámara = atmosférica
Fin de ciclo	Descargar el material esterilizado.	Posibilidad de abrir la puerta de descarga.

Gráfico 5: *Diagrama del ciclo de esterilización por lluvia de agua sobrecalentada con presión compensada*



El proceso consiste básicamente en recircular en forma continua una cantidad de agua grado farmacéutico suficiente para bañar toda la carga. Esta masa de agua es impulsada por una bomba centrifuga, a través de la cámara del esterilizador y de un intercambiador de calor con capacidad para calentar y enfriar. En etapas en las que es necesario aumentar la temperatura, se calienta el agua por medio de vapor industrial y en aquellas etapas en las que es necesario disminuir la temperatura, se enfría el agua por medio de agua fría.

El agua ingresa por el techo de la cámara en forma de lluvia a presión, bañando la carga a esterilizar y aportando o absorbiendo la energía térmica necesaria; luego el agua egresa por la base de la cámara. Durante todo el proceso se presuriza la cámara del esterilizador a presiones levemente superiores a las que corresponden al equilibrio temperatura / presión del vapor saturado, acompañando los ascensos y descensos de temperatura del proceso, logrando de esta manera mantener la integridad de los productos envasados.

Cuando es necesario aumentar la presión de cámara, se inyecta aire comprimido grado farmacéutico y cuando es necesario disminuir la presión de cámara, se ventea el excedente.

Aplicación

En la esterilización de soluciones parenterales de gran volumen. Con el empleo de contenedores de polipropileno, la temperatura del proceso puede aproximarse a la de referencia (121 °C), pero si se utilizan envases de PVC habitualmente se aplican temperaturas entre 115-117 °C. La utilización de envases de polietileno flexible sólo permite tolerar temperaturas de 112-114 °C [3]

Proceso de esterilización por calor seco

Básicamente un proceso de esterilización de una carga termo-resistente, utilizando una estufa con convección forzada de aire consta de las siguientes etapas, en forma secuencial [1,3]:

- Etapa de calentamiento de la cámara y de la carga con circulación forzada del aire por ventiladores: se produce la interacción del aire con los materiales con transferencia de calor por conducción. El material aumenta su temperatura hasta llegar al equilibrio térmico entre el aire caliente y los productos.
- Etapa de esterilizado: una vez alcanzada la temperatura de esterilizado preestablecida para el proceso, medida en un punto de referencia del esterilizador, comienza el tiempo de esterilizado.
- Finalizado el tiempo de esterilizado, se apagan los calefactores y ventiladores.

- Etapa de enfriamiento: se realiza el enfriamiento gradual de la carga y de la cámara hasta la señal de fin de ciclo, estipulada por el fabricante cuando la temperatura medida en el punto de referencia de la cámara sea lo suficientemente baja para no producir riesgo de injurias al abrir la puerta y descargar los productos.

Empaques y envases aplicables al proceso de esterilización por Calor húmedo:

EMPAQUES PARA USO HOSPITALARIO Y PARA INDUSTRIA PRODUCTOS MÉDICOS [1,3,7,12,13]

Papel blanco plano o crepado uso médico.
Telas no tejidas, 100% sintéticas polipropileno no tejido tricapa (SMS), o con combinación de celulosa y fibras sintéticas.
Bobinas termosellables con papel plano y laminado polipropileno - poliéster.
Bolsas de papel plano termosellables
Blíster rígidos polipropileno y papel blanco plano

ENVASES PARA SOLUCIONES PARENTERALES Y PRODUCTOS FARMACÉUTICOS: [3,7]

Ampollas selladas de vidrio
Frasco ampolla de vidrio borosilicato tipo 1 Pyrex ®, o Kimax ®, con sello goma y precinto de aluminio
Container o sachet flexible de PVC
Container o sachet flexible de polietileno alta densidad.

ENVASES PARA INDUSTRIA ALIMENTICIA: [3]

Latas de aluminio
Contenedores rígidos de polipropileno
Contenedores cartón- foil de aluminio

Validación del proceso de esterilización por Calor húmedo

Validar es obtener y documentar evidencias que prueben en forma fehaciente que un equipo y/o proceso cumple en forma consistente y repetitiva con criterios de aceptación predeterminados. En la validación de un proceso de esterilización por calor húmedo distinguimos las siguientes etapas en forma secuencial [7]:

Aptitud del equipo:

- Calificación de la Instalación (I.Q.)
- Calificación Operativa (O.Q.)

Calificación de Desempeño (P.Q.):

- Microbiológica
- Física

Confección del Informe Final de Validación

Aptitud del equipo:

Consiste en ejecutar la Calificación de la instalación (IQ) y la Calificación de la operación (OQ)

- **Calificación de la Instalación (I.Q.)**

  Es la verificación documentada de que todos los aspectos de la instalación del equipo y los suministros de planta son los correctos. Se deben cumplir con las especificaciones del fabricante. [7]

  Estos aspectos son:

  Características del equipo y sus componentes: Se verifica visualmente para los componentes la correspondencia de: tipo, modelo, número de serie, fabricante, en listado tipo "*check list*". Las características

de la estructura principal del esterilizador deben responder a las necesidades del usuario: dimensiones de cámara, cantidad de puertas, sistema de carga, generador de vapor, compresor de aire, etc.

Software: El software instalado en el equipo, al igual que sus funciones, parámetros iniciales y rangos de programación debe ser el especificado por el fabricante y debe validarse. La orientación para la validación del software se puede encontrar en los documentos "*Good automated manufacturing practices: Guide for validation of automated systems in pharmaceutical manufacturing*", GAMP4" [8].

Verificación de los suministros: Para cada uno de los suministros debe verificarse: tensión, presión de línea, capacidad instalada, caudal, calidad, válvula, llave de corte, conexión disponible, etc.

Planos y Manuales de servicio y de operación: Los planos de instalación, de cañerías y de circuitos eléctricos deben estar actualizados, disponer de título, código, revisión y fecha de validez. Los planos deben ser contrastados con el equipo y los servicios. Se debe verificar la existencia de manuales de servicio técnico y de operación, y desarrollar procedimientos escritos para la operación y el mantenimiento del equipo.

Calibración de instrumentos: Deben estar calibrados frente a instrumentos patrón, todos los instrumentos de control, de registro, de referencia visual y de seguridad operativa del esterilizador y de todo el equipamiento accesorio.

Ensayo de calidad del vapor: El ensayo de calidad de vapor debe realizarse a partir de muestras tomadas en el punto de uso. El título o saturación del vapor no debe ser menor al 95%. El porcentaje de aire y gases no condensables no debe superar un 3,5 % V/V; el grado de sobrecalentamiento no debe ser superior a 5 °C. La metodología para la realización de los ensayos de calidad del vapor puede hallarse en detalle descripta en las normas que regulan la construcción y funcionamiento de equipos esterilizadores por vapor. [4,8]

- **Calificación operativa (O.Q.)**

Es la verificación documentada de que el equipo funciona dentro de los límites o rangos predeterminados cuando se lo opera sin carga, bajo instrucciones de uso [7].

Para efectuar los ensayos físicos de calificación operativa del esterilizador y para la posterior calificación física de las cargas, se emplea instrumental de validación.

Este instrumental consiste en sensores de temperatura y presión conectados a adquisidores electrónicos de datos ("validadores") y/o equipos portátiles tipo *data logger*.

Los sensores de temperatura y presión del validador se ingresan a la cámara del esterilizador, a través de una brida / entrada de validación, la que posee un sello hermético. Luego se comienzan a desarrollar las pruebas del OQ.

Normalmente el OQ comienza con pruebas funcionales (alarmas, enclavamientos, puertas, etc.). A continuación, se realiza una prueba de hermeticidad de cámara o "Leak Test" [4,7,8] y un ensayo de remoción de aire y penetración de vapor o "Bowie Dick Test". [4,8]

Todos los instrumentos de validación utilizados deben ser de mayor exactitud que los instrumentos propios del esterilizador y deben estar calibrados. [7]

Prueba de hermeticidad de cámara (Leak test) [1,3,7,8]

La existencia de puntos de ingreso de aire no estéril finalizada la etapa de esterilización a través de válvulas, sellos, entradas de validación, burletes o fisuras del esterilizador, representa un peligro potencial de recontaminación de la carga esterilizada, teniendo en cuenta que finalizada la etapa de esterilizado la carga se encuentra aún con humedad y es especialmente susceptible a contaminación. Para evaluar esta potencial falla de proceso es que se efectúa un Leak test o prueba de fugas.

Se pone a prueba la capacidad de estanqueidad de la cámara sin carga, sometiéndola a una presión absoluta de 70 mbar (vacío profundo), tras lo cual se cierran todas las válvulas. Esta condición se mantiene en forma estática por un lapso de 5 minutos de estabilización más 10 minutos de observación, observando y

registrando con los instrumentos de validación la presión de cámara a cada minuto. Una vez cumplido el tiempo programado, el equipo rompe el vacío de cámara por medio de ingreso de aire filtrado.

El aumento de presión dentro de la cámara durante el tiempo de observación del *test* no debe exceder de 1,3 mbar / minuto o en total 13 mbar / 10 minutos. [3,4]

Test de Bowie- Dick [1,3,4,7,8]

El objetivo el test de Bowie Dick es verificar la eficacia del esterilizador para remover el aire de la cámara y de los paquetes y prevenir su reingreso a través de válvulas, así como la capacidad de penetración rápida y completa del vapor en un paquete poroso normalizado [7], el que se localiza en la posición más desfavorable para la eliminación del aire. El paquete de prueba posee en su interior una hoja impresa con tinta especial sensible al vapor y es sometido a un ciclo con idéntico mecanismo de prevacíos que el empleado para la esterilización de las cargas porosas de rutina, pero sólo con 3,5 minutos de esterilización a 134 °C, o 15 minutos a 121 °C.

Al finalizar la prueba la hoja sensible o testigo ubicada en el centro del test pack debe haber virado de color en toda su superficie en forma pareja, hasta el tono de color final que indica el fabricante del dispositivo. La presencia en la hoja de prueba de una o varias zonas más claras en posición central indica que durante el tiempo de esterilizado, fracciones remanentes de aire no fueron removidas correctamente, impidiendo el contacto con el vapor. [1,3,4,7,8]

En la Figura 3 se muestra un test pack comercial, y en la Figura 4, la interpretación de resultados correctos / erróneos.

Figura 3: *Ejemplo de Test pack comercial antes del ensayo, con hoja de prueba en su interior*

Figura 4: *Hoja de prueba interna, contenida en el centro del test pack.*

Ensayo de distribución de temperatura: [4,7,8]

Para validar el perfil térmico en cámara vacía, se recomienda efectuar 3 ensayos idénticos y consecutivos de distribución de temperatura. Se utilizan habitualmente 12 sensores de temperatura distribuidos en la cámara sin producto, o 1 sensor cada 100 litros de cámara, pero nunca menos que 5 sensores para cualquier volumen de cámara [4] y 1 sensor de presión conectado también a cámara.

Los sensores de temperatura se deben distribuir en la cámara, incluyendo puntos críticos como proximidad de puertas, drenaje del condensado, etc.

En estos ensayos el criterio de aceptación es que se obtenga lo siguiente, una vez finalizado el tiempo de equilibrio [4]:

- Una temperatura de esterilizado dentro del rango -0 / +3 °C del set point.
- La temperatura en cada punto no debe fluctuar más que +/- 1 °C
- La diferencia de temperatura instantánea entre todos los puntos ensayados deber ser ≤ 2 °C.
- La presión de cámara debe fluctuar dentro del rango +/- 5% del valor teórico correspondiente a la curva de vapor saturado a la temperatura del proceso; ésta última determinación es una forma indirecta de medir el grado de sobrecalentamiento del vapor.
- El máximo cambio o variación de presión aceptable en cualquier etapa del ciclo no debe exceder 10 bar/minuto, a fin de preservar la integridad de los empaques.

Calificación de Desempeño (P.Q.):

Es la verificación documentada de que el equipo, calificado previamente como apto, cuando se lo opera con carga de producto, permite obtener en forma reproducible un producto seguro y eficaz [7].

En la calificación de desempeño se procede a realizar los ensayos con la cámara cargada con cada una de las familias de productos a validar, o en su defecto con la carga de referencia, entendiéndose como "carga de referencia" a aquella constituida de modo de representar la combinación más compleja de los productos a esterilizar de rutina [4,7]

Para la carga de referencia, la resistencia a la extracción del aire y el desafío a la penetración del vapor deberían ser iguales o superiores a los correspondientes a cualquier producto médico constitutivo de la familia de productos médicos que se intentan validar. La carga de referencia puede estar constituida por productos médicos reales o simular su composición [8]

Calificación microbiológica [4,7]

Tiene por objeto determinar el tiempo de esterilizado que asegure en todos los puntos de la carga una letalidad suficiente para lograr un SAL de 10^{-6}.

El SAL para el proceso de esterilización se puede establecer de una de las siguientes maneras: [7]

a) Por conocimiento del "*Bioburden*" del producto.

b) Por "*Overkill*".

c) Demostrando que durante el "*Holding Time*" en la etapa de esterilizado, todas las partes del producto fueron expuestas a los valores mínimos para los parámetros del proceso seleccionados de una norma oficial (ej. Farmacopea Nacional).

d) Asignando al producto el proceso aplicable validado sobre la familia de productos, siempre y cuando el tiempo de equilibrio de temperaturas en la meseta de esterilizado no sea superior que el de los productos ya validados de esa familia.

Cualquiera sea el método microbiológico que se emplee, es necesario determinar previamente el *bioburden* de la carga, o recuento de bacterias mesófilas aerobias totales por unidad de producto, considerándose

aceptable que el producto a esterilizar no supere una carga biológica de 10^2 -10^3 UFC/ unidad de producto a esterilizar.

Normalmente se desarrollan los métodos a) y b), cuyos lineamientos desarrollaremos a continuación:

a) Enfoque combinado basado en el bioburden del producto / o enfoque mixto bioburden- inactivación del indicador biológico. (7)

El enfoque basado en el bioburden del producto o el enfoque mixto bioburden con utilización de bioindicadores se utilizan exclusivamente en industria farmacéutica y muy rara vez en la industria de productos médicos. Es un enfoque aplicable en los casos en que el producto a esterilizar pudiera alterarse por efecto de la temperatura, debiendo ser sometido a la mínima exposición térmica que garantice un SAL de 10^{-6}

Una técnica recomendada para llevar a cabo el enfoque mixto bioburden-inactivación del indicador biológico, es aplicar el método desarrollado por Pflug y Holcomb (1983) que consiste en utilizar inóculos desafío en el producto a esterilizar, o colocar bioindicadores dentro del producto, en posiciones en las que las condiciones de esterilización sean más difíciles de alcanzar.

En caso de utilizarse inóculos desafío, los mismos consisten en suspensiones de un microorganismo de resistencia y población superiores a la biocarga propia del producto, cuya composición, población y resistencia promedio se ha evaluado e investigado exhaustivamente en forma previa sobre lotes consecutivos de producto.

Un número predeterminado de inóculos o de unidades de bioindicador, según corresponda, se localizan dentro de la carga, en el interior de los productos.

A continuación, se realizan cinco ensayos con exposición gradual creciente en el tiempo de esterilizado, manteniendo todas las demás variables del ciclo constantes.

Después de cada una de las cinco exposiciones, se procede a cultivar los productos inoculados o los bioindicadores, evaluando como punto final el desarrollo o ausencia de crecimiento microbiano. Se determina para cada tiempo de exposición la proporción de los inóculos que no desarrolla luego de la incubación, proporción que se denomina “fracción negativa”.

Obtenida la fracción negativa en cada una de las cinco corridas, por utilización de fórmulas se calcula el D (coeficiente de reducción decimal) del inóculo de prueba o del bioindicador en las condiciones experimentales reales. Conocido este valor D experimental, se calcula por fórmulas el tiempo de exposición al vapor de agua para lograr la reducción de 12 logaritmos de población del inóculo de referencia. Este tiempo consistirá entonces el tiempo de esterilizado para el ciclo productivo.

b.) Enfoque conservador del overkill, método del medio ciclo. (7)

El objetivo del ensayo es determinar el tiempo de esterilizado que permite en los ciclos productivos asegurar la inactivación de 12 log de un esporulado de referencia con $D_{121,1} \geq 1,5$ minutos, y lograr un SAL de 10^{-6}**.**

Para ello se colocan los bioindicadores (IB) dentro de la carga, en un número acorde al volumen de la carga(8) Se recomiendan 12 IB por carga. La posición de los bioindicadores dentro de la carga debe realizarse en posiciones estratégicas que se detecten como puntos dificultosos para la remoción del aire y/o que presenten dificultad para el acceso al vapor. (8)

Se somete la carga al proceso realizando tres ensayos consecutivos con idéntico tiempo de exposición, debiendo demostrarse en forma repetitiva la inactivación de todos los bioindicadores *Geobacillus stearothermophillus* con población mínima $1x10^6$ y valor $D_{121,1} \geq 1,5$ min a 121 °C.

Cumplido el criterio de aceptación, el tiempo de esterilizado para un ciclo se define como el doble de tiempo que el utilizado en los ensayos de validación. Este valor asegura una reducción de 12D del esporulado de referencia.

Este enfoque conservador es el que se utiliza habitualmente en la industria de productos médicos durante la validación de una familia de productos, siempre y cuando el material constitutivo no presenta alteraciones

por tiempos de exposición prolongados al vapor. En caso en que esto ocurriera, el enfoque de elección sería el descripto previamente en a).

El overkill también es el enfoque de elección en instituciones de salud para la validación de cargas de referencia mixtas, en la que los productos médicos son reutilizables, debido a que su nivel de contaminación antes de la esterilización es difícil de estandarizar, validar y controlar.

Calificación física [4,7]

Los sensores de temperatura se colocan dentro de la carga, perforando los empaques. En la validación de cargas líquidas deben colocarse en el interior de los envases, sumergidos en el líquido.

La cantidad de repeticiones de cada ensayo debe ser de un mínimo de tres para demostrar reproducibilidad[7]. La cantidad de sensores en cada ensayo de acuerdo al volumen de la carga se detalla en la normativa de referencia [4,7]. Se recomiendan 12 sensores de temperatura en contacto con el producto, o 1 sensor cada 100 litros de cámara, pero nunca menos que 5 sensores para cualquier volumen de cámara y 1 sensor de presión. [4]

Ensayo de penetración de temperatura:

En los ensayos de penetración de temperatura el criterio de aceptación es obtener lo siguiente, una vez finalizado el tiempo de equilibrio [4]:

- Una temperatura en esterilizado dentro del rango -0 / +3 °C del set point.
- La temperatura en cada punto no debe fluctuar más que +/- 1, 5 °C
- La diferencia de temperatura instantánea entre todos los puntos ensayados deber ser ≤ 2 °C.
- La presión de cámara debe fluctuar dentro del rango +/- 5% del valor teórico correspondiente a la curva de vapor saturado a la temperatura del proceso.
- El máximo cambio o variación de presión aceptable en cualquier parte del ciclo no debe exceder 10 bar/ minuto, a fin de preservar la integridad de empaques y producto [4]
- Se procede con el adquisidor de datos, a calcular el valor F_0 (letalidad microbiológica expresada matemáticamente). Generalmente se acepta F_0 en el punto más frío (F_0 mínimo) de 12 minutos.

Informe final de validación:

El informe debe reunir o recopilar toda la documentación obtenida en la validación, en forma ordenada, detallada y secuencia [7]. El mismo debería incluir:

- Especificaciones del esterilizador y del equipamiento de validación.
- Registros de calibración de instrumentos de validación.
- Registros físicos de todos los ensayos del OQ.
- Detalle de los productos, envases, diagrama de cargas utilizadas.
- Resultados de las pruebas biológicas del PQ.
- Registros físicos de todos los ensayos del PQ.
- Hoja de especificaciones para el proceso, con el valor y rango permitido para cada variable física del proceso en cada etapa.
- Registros de firmas responsables.

Recalificación del proceso:

Se debe recalificar el proceso cada vez que haya cambios críticos en el equipamiento, en el proceso, en la composición o sistema de envasado del producto médico, en la configuración de carga, o debido a cambios en los requerimientos regulatorios.

Aún en los casos en que no se hubieran producido cambios en el proceso o equipamiento, debería recalificarse el proceso a intervalos periódicos definidos por el fabricante [7].

Este período no está estrictamente especificado en normas, pero lo recomendable es realizar mínimamente una recalificación anual.[8]

Si no se han realizado cambios críticos que requieran una recalificación de las instalaciones, la recalificación se aplicará exclusivamente a la Calificación de desempeño. [8]

Del mismo modo, si se pretende validar la esterilización de un nuevo producto médico o familia de productos, utilizando un esterilizador y un proceso previamente validados, es aceptable omitir la repetición de las etapas del IQ y OQ y efectuar exclusivamente la Calificación de desempeño [7]

La periodicidad y alcance de la recalificación debe justificarse por escrito. [7,8]

Es recomendable comparar los registros de los ensayos de recalificación con los de la validación original, manteniendo el mismo formato en la documentación. [7,8]

Monitoreo y control de ciclos de rutina

MONITOREO PERIÓDICO DEL EQUIPO ESTERILIZADOR

Además de la revalidación periódica del esterilizador y de la calidad del suministro de vapor; se debe asegurar diariamente el correcto funcionamiento de los ciclos de remoción de aire por prevacíos mediante la realización de un ciclo automático de Bowie Dick. [3,4,9,10,14]

Semanalmente, o preferentemente con frecuencia diaria, debe efectuarse una prueba de fuga en cámara o "leak test" [3,4]

MONITOREO DE PARÁMETROS FÍSICOS:

Los parámetros físicos a monitorear y registrar para cada proceso y cada lote de producto esterilizado son: [7,9,10]

- Nivel de vacío en cámara en la etapa de remoción del aire
- Presión de cámara en los pulsos de vapor en la etapa de remoción del aire
- Temperatura de esterilizado
- Tiempo de esterilizado
- Presión de cámara en esterilizado
- Nivel de vacío en el secado
- Tiempo de secado

MONITOREO QUÍMICO:

Se utiliza un control químico externo (tipo I Norma ISO 11.140), bajo la forma de cintas o etiquetas autoadhesivas, [9,10] en cada empaque primario y secundario, sólo con fines de diferenciar visualmente los productos que atravesaron un ciclo de esterilización respecto de los no procesados.

La utilización de controles multiparámetro e integradores (tipo IV y V de la citada norma) [9,10] se reserva para control interno de cada paquete, con localización interna en el punto de más difícil acceso al vapor de agua.

Se debe verificar un cambio neto al punto final especificado por el fabricante finalizado el ciclo de esterilización, en todos los indicadores químicos. [7,15]

MONITOREO BIOLÓGICO:

Para el monitoreo de los procesos de esterilización por calor húmedo se emplean de rutina esporas de *Geobacillus stearothermophillus* [14]

Los bioindicadores para el monitoreo de rutina de esterilización de cargas sólidas porosas y cargas sólidas huecas se colocan en productos simulados (PCD'S), en posiciones comprometidas para la penetración del vapor. [4,7,8]

Pueden utilizarse [3,14]:

- ✓ tiras comerciales de papel de filtro inoculadas con esporas de *Geobacillus stearothermophillus,* diseñadas para posterior transferencia aséptica en medio de cultivo estéril (incubación y lectura 7 días).
- ✓ dispositivos autocontenidos conteniendo la tira de papel de filtro inoculada con el IB y una ampolla de vidrio frágil sellada hermética con medio de cultivo estéril, para posterior cultivo directo del dispositivo sin necesidad de transferencia aséptica (incubación y lectura 48 horas).

Para el monitoreo de la esterilización de soluciones parenterales en envases flexibles y líquidos en envases rígidos, deben utilizarse [3]:

- ✓ ampollas selladas de vidrio conteniendo la suspensión del IB en medio de cultivo estéril, para posterior cultivo directo sin necesidad de transferencia aséptica (incubación y lectura 7 días).

Finalizado el período de incubación a 55-60 °C [5], se interpretan los resultados como obtención de desarrollo (resultado positivo) o ausencia de desarrollo (resultado negativo). [14]

En la esterilización de cargas hospitalarias, se recomienda una frecuencia semanal de utilización, o preferentemente diaria y obligatoriedad de monitoreo biológico en los ciclos de esterilización de cargas con implantes. [9,10]

En la industria de productos médicos e industria farmacéutica, la utilización de IB en los ciclos productivos no está indicada obligatoriamente, siendo aún requisito por protocolo interno del laboratorio la realización de test de esterilidad para proceder a la aprobación y liberación del lote [3] (ver USP *General Chapter* <71> *Sterility tests*).

Liberación de la carga [4,7,8]

Cumplimiento de todas las especificaciones de los parámetros físicos.

Cambio al punto final de los indicadores químicos.

Inactivación de todos los B.I (si los mismos fueron utilizados).

Test de esterilidad de muestras representativas del lote con resultado negativo (si el protocolo interno del fabricante exige este requisito).

Es la verificación documentada de que el equipo, calificado previamente como apto, cuando se lo opera con carga de producto, permite obtener en forma reproducible un producto seguro y eficaz [7].

En la calificación de desempeño se procede a realizar los ensayos con la cámara cargada con cada una de las familias de productos a validar, o en su defecto con la carga de referencia, entendiéndose como "carga de referencia" a aquella constituida de modo de representar la combinación más compleja de los productos a esterilizar de rutina [4,7]

Para la carga de referencia, la resistencia a la extracción del aire y el desafío a la penetración del vapor deberían ser iguales o superiores a los correspondientes a cualquier producto médico constitutivo de la familia de productos médicos que se intentan validar. La carga de referencia puede estar constituida por productos médicos reales o simular su composición [8]

Calificación microbiológica [4,7]

Tiene por objeto determinar el tiempo de esterilizado que asegure en todos los puntos de la carga una letalidad suficiente para lograr un SAL de 10^{-6}.

El SAL para el proceso de esterilización se puede establecer de una de las siguientes maneras: [7]

e) Por conocimiento del "*Bioburden*" del producto.

f) Por "*Overkill*".

g) Demostrando que durante el "*Holding Time*" en la etapa de esterilizado, todas las partes del producto fueron expuestas a los valores mínimos para los parámetros del proceso seleccionados de una norma oficial (ej. Farmacopea Nacional).

h) Asignando al producto el proceso aplicable validado sobre la familia de productos, siempre y cuando el tiempo de equilibrio de temperaturas en la meseta de esterilizado no sea superior que el de los productos ya validados de esa familia.

Cualquiera sea el método microbiológico que se emplee, es necesario determinar previamente el *bioburden* de la carga, o recuento de bacterias mesófilas aerobias totales por unidad de producto, considerándose aceptable que el producto a esterilizar no supere una carga biológica de 10^2 -10^3 UFC/ unidad de producto a esterilizar.

Normalmente se desarrollan los métodos a) y b), cuyos lineamientos desarrollaremos a continuación:

a) Enfoque combinado basado en el bioburden del producto / o enfoque mixto bioburden- inactivación del indicador biológico. (7)

El enfoque basado en el bioburden del producto o el enfoque mixto bioburden con utilización de bioindicadores se utilizan exclusivamente en industria farmacéutica y muy rara vez en la industria de productos médicos. Es un enfoque aplicable en los casos en que el producto a esterilizar pudiera alterarse por efecto de la temperatura, debiendo ser sometido a la mínima exposición térmica que garantice un SAL de 10^{-6}

Una técnica recomendada para llevar a cabo el enfoque mixto bioburden-inactivación del indicador biológico, es aplicar el método desarrollado por Pflug y Holcomb (1983) que consiste en utilizar inóculos desafío en el producto a esterilizar, o colocar bioindicadores dentro del producto, en posiciones en las que las condiciones de esterilización sean más difíciles de alcanzar.

En caso de utilizarse inóculos desafío, los mismos consisten en suspensiones de un microorganismo de resistencia y población superiores a la biocarga propia del producto, cuya composición, población y resistencia promedio se ha evaluado e investigado exhaustivamente en forma previa sobre lotes consecutivos de producto. Un número predeterminado de inóculos o de unidades de bioindicador, según corresponda, se localizan dentro de la carga, en el interior de los productos.

A continuación, se realizan cinco ensayos con exposición gradual creciente en el tiempo de esterilizado, manteniendo todas las demás variables del ciclo constantes.

Después de cada una de las cinco exposiciones, se procede a cultivar los productos inoculados o los bioindicadores, evaluando como punto final el desarrollo o ausencia de crecimiento microbiano. Se determina para cada tiempo de exposición la proporción de los inóculos que no desarrolla luego de la incubación, proporción que se denomina "fracción negativa".

Obtenida la fracción negativa en cada una de las cinco corridas, por utilización de fórmulas se calcula el D (coeficiente de reducción decimal) del inóculo de prueba o del bioindicador en las condiciones experimentales reales. Conocido este valor D experimental, se calcula por fórmulas el tiempo de exposición al vapor de agua para lograr la reducción de 12 logaritmos de población del inóculo de referencia. Este tiempo consistirá entonces el tiempo de esterilizado para el ciclo productivo.

b.) Enfoque conservador del overkill, método del medio ciclo. (7)

El objetivo del ensayo es determinar el tiempo de esterilizado que permite en los ciclos productivos asegurar la inactivación de 12 log de un esporulado de referencia con $D_{121,1} \geq 1,5$ minutos, y lograr un SAL de 10^{-6}**.**

Para ello se colocan los bioindicadores (IB) dentro de la carga, en un número acorde al volumen de la carga(8) Se recomiendan 12 IB por carga. La posición de los bioindicadores dentro de la carga debe realizarse en posiciones estratégicas que se detecten como puntos dificultosos para la remoción del aire y/o que presenten dificultad para el acceso al vapor. (8)

Se somete la carga al proceso realizando tres ensayos consecutivos con idéntico tiempo de exposición, debiendo demostrarse en forma repetitiva la inactivación de todos los bioindicadores *Geobacillus stearothermophillus* con población mínima $1x10^6$ y valor $D_{121,1} \geq 1,5$ min a 121 °C.

Cumplido el criterio de aceptación, el tiempo de esterilizado para un ciclo se define como el doble de tiempo que el utilizado en los ensayos de validación. Este valor asegura una reducción de 12D del esporulado de referencia.

Este enfoque conservador es el que se utiliza habitualmente en la industria de productos médicos durante la validación de una familia de productos, siempre y cuando el material constitutivo no presenta alteraciones por tiempos de exposición prolongados al vapor. En caso en que esto ocurriera, el enfoque de elección sería el descripto previamente en a).

El overkill también es el enfoque de elección en instituciones de salud para la validación de cargas de referencia mixtas, en la que los productos médicos son reutilizables, debido a que su nivel de contaminación antes de la esterilización es difícil de estandarizar, validar y controlar.

Calificación física [4,7]

Los sensores de temperatura se colocan dentro de la carga, perforando los empaques. En la validación de cargas líquidas deben colocarse en el interior de los envases, sumergidos en el líquido.

La cantidad de repeticiones de cada ensayo debe ser de un mínimo de tres para demostrar reproducibilidad[7]. La cantidad de sensores en cada ensayo de acuerdo al volumen de la carga se detalla en la normativa de referencia [4,7]. Se recomiendan 12 sensores de temperatura en contacto con el producto, o 1 sensor cada 100 litros de cámara, pero nunca menos que 5 sensores para cualquier volumen de cámara y 1 sensor de presión. [4]

Ensayo de penetración de temperatura:

En los ensayos de penetración de temperatura el criterio de aceptación es obtener lo siguiente, una vez finalizado el tiempo de equilibrio [4]:

- Una temperatura en esterilizado dentro del rango -0 / +3 °C del set point.
- La temperatura en cada punto no debe fluctuar más que +/- 1, 5 °C
- La diferencia de temperatura instantánea entre todos los puntos ensayados deber ser ≤ 2 °C.
- La presión de cámara debe fluctuar dentro del rango +/- 5% del valor teórico correspondiente a la curva de vapor saturado a la temperatura del proceso.
- El máximo cambio o variación de presión aceptable en cualquier parte del ciclo no debe exceder 10 bar/minuto, a fin de preservar la integridad de empaques y producto [4]
- Se procede con el adquisidor de datos, a calcular el valor F_0 (letalidad microbiológica expresada matemáticamente). Generalmente se acepta F_0 en el punto más frío (F_0 mínimo) de 12 minutos.

Informe final de validación:

El informe debe reunir o recopilar toda la documentación obtenida en la validación, en forma ordenada, detallada y secuencia [7]. El mismo debería incluir:

- Especificaciones del esterilizador y del equipamiento de validación.
- Registros de calibración de instrumentos de validación.
- Registros físicos de todos los ensayos del OQ.
- Detalle de los productos, envases, diagrama de cargas utilizadas.
- Resultados de las pruebas biológicas del PQ.
- Registros físicos de todos los ensayos del PQ.
- Hoja de especificaciones para el proceso, con el valor y rango permitido para cada variable física del proceso en cada etapa.
- Registros de firmas responsables.

Recalificación del proceso:

Se debe recalificar el proceso cada vez que haya cambios críticos en el equipamiento, en el proceso, en la composición o sistema de envasado del producto médico, en la configuración de carga, o debido a cambios en los requerimientos regulatorios.

Aún en los casos en que no se hubieran producido cambios en el proceso o equipamiento, debería recalificarse el proceso a intervalos periódicos definidos por el fabricante [7]. Este período no está estrictamente especificado en normas, pero lo recomendable es realizar mínimamente una recalificación anual.[8]

Si no se han realizado cambios críticos que requieran una recalificación de las instalaciones, la recalificación se aplicará exclusivamente a la Calificación de desempeño. [8]

Del mismo modo, si se pretende validar la esterilización de un nuevo producto médico o familia de productos, utilizando un esterilizador y un proceso previamente validados, es aceptable omitir la repetición de las etapas del IQ y OQ y efectuar exclusivamente la Calificación de desempeño [7]

La periodicidad y alcance de la recalificación debe justificarse por escrito. [7,8]

Es recomendable comparar los registros de los ensayos de recalificación con los de la validación original, manteniendo el mismo formato en la documentación. [7,8]

Monitoreo y control de ciclos de rutina

MONITOREO PERIÓDICO DEL EQUIPO ESTERILIZADOR

Además de la revalidación periódica del esterilizador y de la calidad del suministro de vapor; se debe asegurar diariamente el correcto funcionamiento de los ciclos de remoción de aire por prevacíos mediante la realización de un ciclo automático de Bowie Dick. [3,4,9,10,14]

Semanalmente, o preferentemente con frecuencia diaria, debe efectuarse una prueba de fuga en cámara o "leak test" [3,4]

MONITOREO DE PARÁMETROS FÍSICOS:

Los parámetros físicos a monitorear y registrar para cada proceso y cada lote de producto esterilizado son: [7,9,10]

- Nivel de vacío en cámara en la etapa de remoción del aire
- Presión de cámara en los pulsos de vapor en la etapa de remoción del aire
- Temperatura de esterilizado
- Tiempo de esterilizado
- Presión de cámara en esterilizado
- Nivel de vacío en el secado
- Tiempo de secado

MONITOREO QUÍMICO:

Se utiliza un control químico externo (tipo I Norma ISO 11.140), bajo la forma de cintas o etiquetas autoadhesivas[9,10], en cada empaque primario y secundario, sólo con fines de diferenciar visualmente los productos que atravesaron un ciclo de esterilización respecto de los no procesados.

La utilización de controles multiparámetro e integradores (tipo IV y V de la citada norma) [9,10] se reserva para control interno de cada paquete, con localización interna en el punto de más difícil acceso al vapor de agua.

Se debe verificar un cambio neto al punto final especificado por el fabricante finalizado el ciclo de esterilización, en todos los indicadores químicos. [7,15]

MONITOREO BIOLÓGICO:

Para el monitoreo de los procesos de esterilización por calor húmedo se emplean de rutina esporas de *Geobacillus stearothermophillus* [14].

Los bioindicadores para el monitoreo de rutina de esterilización de cargas sólidas porosas y cargas sólidas huecas se colocan en productos simulados (PCD'S), en posiciones comprometidas para la penetración del vapor. [4,7,8]

Pueden utilizarse [3,14]:

- ✓ tiras comerciales de papel de filtro inoculadas con esporas de *Geobacillus stearothermophillus,* diseñadas para posterior transferencia aséptica en medio de cultivo estéril (incubación y lectura 7 días)
- ✓ dispositivos autocontenidos conteniendo la tira de papel de filtro inoculada con el IB y una ampolla de vidrio frágil sellada hermética con medio de cultivo estéril, para posterior cultivo directo del dispositivo sin necesidad de transferencia aséptica (incubación y lectura 48 horas)

Para el monitoreo de la esterilización de soluciones parenterales en envases flexibles y líquidos en envases rígidos, deben utilizarse [3]:

- ✓ ampollas selladas de vidrio conteniendo la suspensión del IB en medio de cultivo estéril, para posterior cultivo directo sin necesidad de transferencia aséptica (incubación y lectura 7 días)

Finalizado el período de incubación a 55-60 °C [5], se interpretan los resultados como obtención de desarrollo (resultado positivo) o ausencia de desarrollo (resultado negativo). [14]

En la esterilización de cargas hospitalarias, se recomienda una frecuencia semanal de utilización, o preferentemente diaria y obligatoriedad de monitoreo biológico en los ciclos de esterilización de cargas con implantes. [9,10]

En la industria de productos médicos e industria farmacéutica, la utilización de IB en los ciclos productivos no está indicada obligatoriamente, siendo aún requisito por protocolo interno del laboratorio la realización de test de esterilidad para proceder a la aprobación y liberación del lote [3] (ver USP *General Chapter* <71> *Sterility tests*).

Liberación de la carga [4,7,8]

Cumplimiento de todas las especificaciones de los parámetros físicos.

Cambio al punto final de los indicadores químicos.

Inactivación de todos los B.I (si los mismos fueron utilizados).

Test de esterilidad de muestras representativas del lote con resultado negativo (si el protocolo interno del fabricante exige este requisito).

Aplicación en industrias e instituciones de salud, incompatibilidades y limitaciones del método

El vapor de agua saturado bajo presión es el agente esterilizante de elección en todo el mundo en centros para el cuidado de la salud, laboratorios de microbiología y en la industria de fármacos y de productos médicos estériles[1,2] excepto cuando la penetración del vapor o la temperatura del proceso generaran daños o deterioro al producto. La utilización de metodologías alternativas sólo se justifica para aquellos materiales susceptibles de dañarse por acción del calor o de la humedad. [2]

Una de las consideraciones a tener en cuenta es la relación entre la velocidad de degradación del material y la velocidad de inactivación biológica. [1] Varios estudios realizados sobre el daño producido en textiles y gomas bajo diferentes condiciones operativas (Medical Research Council, 1964; Henry, 1964; Fallon and Payne, 1963) y sobre degradación de nutrientes (Stumbo, 1973) demostraron que cortos tiempos y altas temperaturas tuvieron menor efecto deletéreo para una inactivación bacteriana equivalente [1]. Es conocido el sufrimiento de las proteínas bajo tratamiento con calor húmedo y la caramelización de los carbohidratos, hechos a tener en cuenta en el diseño del proceso de esterilización de soluciones parenterales. [1]

La pérdida del valor nutricional debida al tratamiento térmico de alimentos ha quedado minimizada con el advenimiento de la técnica de ultra–alta–temperatura (UHT), en la que los productos líquidos o semifluidos a

esterilizar son sometidos a temperaturas ≥ 132 °C en proceso continuo durante un tiempo corto de exposición, y enfriados inmediatamente utilizando intercambiadores de calor, resultando en mínimos cambios organolépticos y casi nula degradación catabólica de nutrientes. [1]

En relación al calor seco, su empleo está discontinuado en instituciones de salud, quedando restringido a la esterilización de sustancias químicas en polvo no inactivables por vapor, vaselina, aceites, y contenedores de vidrio o de metal. En el campo de industria farmacéutica se puede mencionar la esterilización de inyectables de base oleosa, usualmente contenidos en ampollas de vidrio, así como otros productos grasos (por ejemplo, silicona utilizada para lubricación de catéteres, parafina líquida y glicerina) [3]

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, su principal aplicación en la industria farmacéutica es para despirogenado de recipientes de vidrio y piezas metálicas y no en la esterilización de productos medicinales. [1,3]

El calor seco no tiene campo de aplicación en la industria de productos médicos.

Compatibilidades calor húmedo:[2,3]

En referencia a los materiales constitutivos de productos a esterilizar por calor húmedo podemos mencionar:[3] Teflón / PTFE, silicona fluida, caucho de silicona, gomas naturales, policarbonato, polisulfona, polipropileno, acrílicos, algodón y algodón-poliéster, cerámicas, rayón, vidrio, madera, acero inoxidable, titanio y aleaciones de titanio, aluminio, soluciones con principios activos o nutricionales con base acuosa y geles acuosos.

Incompatibilidades calor húmedo: [2,3]

Polvos de naturaleza mineral u orgánica, vaselinas, productos alimenticios grasos o no emulsionables y principios activos degradables por la temperatura del proceso.

En referencia al campo de aplicación de la esterilización por calor húmedo destacamos: [1,3]

Industria farmacéutica: inyectables monodosis, inyectables multidosis, soluciones parenterales y no parenterales de gran volumen; insumos utilizados en áreas de contaminación controlada.

Industria de productos médicos: prótesis vasculares, prótesis mitrales y aórticas mecánicas, ropa quirúrgica, gasa, vendas, lentes de contacto hidrófilas, envases de polipropileno para recolección de muestras biológicas, filtros para hemodiálisis.

Instituciones de salud: instrumental quirúrgico, piezas de mano de equipos médicos, material de curación, textiles naturales y sintéticos, material de terapia respiratoria reutilizable.

Laboratorio de microbiología: medios de cultivo, soluciones buffers, inactivación de muestras contaminadas, esterilización de instrumentos utilizados en la manipulación y análisis de muestras biológicas.

Industria alimenticia: conservas de fruta y carne, leche y jugos de fruta.

Compatibilidades calor seco:[1,2,3]

El calor seco debería utilizarse como agente esterilizante solamente para aquellos materiales que no pueden ser esterilizados por vapor de agua, ya fuera por ser susceptibles a daños por acción de la humedad, o por ser impermeables a ella. Como ejemplos se puede mencionar a la vaselina o petrolato, los aceites, vidrios, y sustancias químicas en polvo no alterables por calor.

Incompatibilidades calor seco: [2,3]

Cualquier sustancia sólida o líquida que se descomponga o altere su estructura al ser sometida a temperaturas ≥ 160 °C.

Bibliografía:

1. Seymour S. Block: *Desinfection, Sterilization and Preservation*, fourth Ed., Lea & Febiger, Part IV, 29. p.527, U.K., 1991
2. Gardner, J.F. and Peel, M.M.: *Introduction to Sterilization and Desinfection: Sterilization by gaseous chemicals*. Edimburgh, Churchill Livingstone, 1991.
3. Hanchock, Ch. in: Russell, A.D.; Hugo, W.B.; Ayliffe, G.A.J.: *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, *5th.Ed. Chapter 15.1: Heat Sterilization*, p.277. Blackwell Scientific Publications; Oxford, 2013.
4. EN 285:2016: *Sterilization- Steam sterilizers- Large sterilizers*, 2016.
5. ISO 11138-3: 2017: *Sterilization of Health Care products: Biological Indicators*. Part 3: *B.I. for moist heat sterilization processes*, 2017.
6. ISO 11138-4: 2017**:** *Sterilization of Health Care products: Biological Indicators*. Part 4 : *B.I. for dry heat sterilization processes*, 2017.
7. ISO 17665-1: 2006: *Sterilization of health care products- Moist heat-* Part 1: *Requirements for development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices*, 2006.
8. ISO 17665-2: 2009: *Sterilization of health care products- Moist heat-* Part 2: *Guidance of the application of ISO 17665:1- 2006;* 2009
9. Resolución 1547:2007: *Guía de procedimientos y Métodos de Esterilización y Desinfección para Establecimientos de salud públicos y privados*, p.17-18. Ministerio de Salud, 2007.
10. ANSI/ AAMI ST79:2017: *Comprehensive guide to steam sterilization and sterility assurance in health care facilities*; Arlington, Virginia, 2017
11. IRAM 37100-4:1998: Esterilización. Esterilizadores por calor seco. Esterilizadores con circulación forzada del aire; 1998
12. UNE-EN ISO 11607-1:2017: *Envasado para productos sanitarios esterilizados terminalmente. Parte 1: Requisitos para los materiales, los sistemas de barrera estéril y sistemas de envasado;* 2017
13. UNE-EN ISO 11607-2:2017: *Envasado para productos sanitarios esterilizados terminalmente. Parte 2: Requisitos para procesos de conformación, sellado y ensamblado;*2017
14. ISO 11140-3: 2007: *Sterilization of Health Care products. Chemical indicators*. Part 3: *Class 2 indicator systems for use in the Bowie Dick test steam penetration test*; 2nd Ed, 2007.
15. ISO 11140-1: 2014: "*Sterilization of Health Care products. Chemical indicators*. Parte 1: *General*"; 2nd Ed, 2014.

Capítulo II.2.B

Esterilización con Radiaciones ionizantes

Celina Horak

Fundamentos del método

Instalaciones de irradiación

Efecto de las radiaciones sobre los microorganismos

Efecto de las radiaciones en los materiales

Diseño de producto, proceso y Validación de la irradiación

Monitoreo y control de rutina

Conclusiones sobre el método

Bibliografía

Fundamentos del método

Las radiaciones ionizantes se utilizan para tratar una gran diversidad de productos con distintos objetivos. Entre las principales aplicaciones se puede mencionar la *esterilización* de productos de uso médico, de tejidos biológicos para implante, productos odontológicos, farmacéuticos, envases; y la *descontaminación* de materias primas, cosméticos y alimentos.

La esterilización por irradiación de productos médicos fue iniciada industrialmente por Ethicon en el año 1956 en EE.UU, con la irradiación de hilos de sutura. En Argentina, los estudios para implementar comercialmente esta tecnología iniciaron en 1964 con la adquisición de un irradiador autoblindado, y en 1970 ya se inauguraba la primer Planta de Irradiación semi-industrial multipropósito en CNEA (Comisión Nacional de Energía Atómica) con diseño de ingeniería propio.

En la actualidad más de 200 instalaciones de irradiación gamma comerciales a gran escala están en operación en 50 países, para irradiar más de 400 millones de pies cúbicos de productos al año. Aproximadamente la mitad es para esterilización de productos médicos y la otra mitad incluye también otros objetivos, tales como desinfección / desinfestación de otros productos[(1)].Con el fin de asegurar la eficacia del proceso de esterilización, desde la década de 1960 se han utilizado guías para definir la dosis de esterilización por irradiación en base a diversos criterios, tales como:

- Cálculos basados en una curva de inactivación del organismo más resistente a la radiación aislado hasta entonces (esporas de *Bacillus sphaericus* C1-A) y en las condiciones más adversas;
- el uso de indicadores biológicos (esporas de *Bacillus pumilus* E601) durante el proceso de esterilización;
- y en la década de los 80 se comenzó a usar la información derivada de la inactivación de la población microbiana aislada de productos médicos en su estado natural. Se diseñó un modelo probabilístico para la inactivación de la población microbiana, en base a los datos experimentales. Hoy en día se utilizan las Normas ISO 11137[5,6], que utilizan en sus metodologías dicho diseño probabilístico.

El proceso de irradiación consiste en exponer los productos frente al campo de radiación durante el tiempo necesario para que los productos absorban la energía suficiente para alcanzar el objetivo buscado. Esta energía

transferida por la radiación incidente al material irradiado –*dosis absorbida o dosis*- es la responsable de producir en el material irradiado iones y especies excitadas y por lo tanto, modificaciones químicas y biológicas de interés. Es por ello que la dosis es la magnitud de principal interés.

Dicha dosis (cuya unidad es el Gray, en el sistema internacional), equivale a la energía absorbida por unidad de masa de producto (Joule /kg):

$$D\ (Gy) = \frac{E\ (Joule)}{m\ (kg)}$$

La *dosimetría* es la herramienta metrológica utilizada para medir la dosis absorbida por el producto. Permite además determinar el modelo de distribución de dosis en el producto empacado, controlar el proceso de irradiación de rutina, caracterizar la dosis en aire en el recinto de irradiación y en las distintas posiciones del sistema de transporte, entre otros usos relevantes.

La dosimetría se lleva a cabo mediante un sistema dosimétrico, que consiste de:

- Dosímetro físico o químico (elemento que sufre un cambio inducido específicamente por la irradiación, y que permite que sea detectable, estable y reproducible)
- Instrumento calibrado que mide el efecto inducido en el dosímetro
- Procedimientos operativos escritos para la medición, basados en Normas estandarizadas reconocidas
- Trazabilidad de la medición a un laboratorio primario

El sistema dosimétrico debe asegurar la medición de la dosis absorbida, con su incertidumbre asociada y garantizar que el resultado obtenido sea reproducible y cuantificable. Para garantizar la medición de la dosis, cada laboratorio dosimétrico calibra su sistema dosimétrico con un laboratorio de referencia secundaria (nacional o regional) que a su vez calibra sus sistemas contra laboratorios primarios. En Argentina el laboratorio secundario de referencia es el Laboratorio de Dosimetría de altas Dosis de la Comisión Nacional de Energía Atómica, quien calibra a su vez su sistema contra el *National Physical Laboratory* (NPL) de Reino Unido.

El proceso de irradiación utilizado para la esterilización o descontaminación es una etapa del proceso de fabricación del producto (que puede ser una materia prima o un componente), y por lo tanto se deben aplicar las buenas prácticas de irradiación (BPI), armonizadas con las buenas prácticas de fabricación. Estas BPI (Figura 1) incluyen en una etapa inicial, la definición de producto (donde se identifica y caracteriza el producto a irradiar), la definición del proceso(donde se realizan los ensayos correspondientes para establecer el rango de dosis mínima y máxima que debe recibir el producto),la validación del proceso de irradiación; y una vez cumplimentada estas etapas, demostrar que el producto y proceso así validados serán llevados a cabo controlados en forma rutinaria en las mismas condiciones establecidas en la validación. Luego se deberán realizar verificaciones periódicas para el mantenimiento de la validación.

Figura 1: *Esquema que resume las buenas prácticas de irradiación de un producto para su esterilización o descontaminación*

Instalaciones de irradiación

El proceso de irradiación se puede llevar a cabo en distintos tipos de instalaciones. Existen distintas clases de instalaciones de irradiación donde puede llevarse a cabo el proceso antes descripto. Dichas instalaciones se pueden clasificar de acuerdo al tipo de fuente (radionucleídos o máquinas), aplicación (esterilización, irradiación

de alimentos, etc.), productos (específico o multipropósito), modalidad de irradiación (continuo o por lotes), sistema de transporte (estático, dinámico, simple o multipasadas), entre otros.

Todas las instalaciones de irradiación están constituidas mínimamente por los siguientes componentes:

- Fuente de radiación: donde son generadas por Radioisótopos (^{60}Co, ^{137}Cs) o máquinas aceleradores de electrones (0,1 a 10 MeV) con o sin conversión de Rayos X)
- Recinto de irradiación con blindaje adecuado
- Sistema de transporte de producto
- Depósito diferenciado para productos irradiados y no irradiados
- Sistemas auxiliares
- Sistemas de seguridad y control
- Sistema de control de proceso

Las características generales de las fuentes de irradiación se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. *Características de las Fuentes de irradiación*

	Radiación gamma/ Rayos X (5MeV)	Electrones acelerados (0,1 MeV – 10MeV)
Compuesto por	fotones	Electrones (partículas)
Masa	NO	SI
Carga eléctrica	NO	SI
Penetración	Buena/muy buena	Limitada

Irradiadores gamma: utilizan principalmente fuentes selladas de ^{60}Co, un radionucleído artificial producido en un reactor nuclear (en Argentina es producido en la Central de Embalse Río Tercero). El decaimiento natural del mismo emite dos fotones con energías de 1,17MeVy 1.33MeV. La fuente está conformada por los *slugs* del Cobalto obtenido en la central, los cuales son doblemente encapsulados en varillas de acero inoxidable selladas, las que a su vez son colocadas en una estructura portafuentes (forma de placa o cilindro).

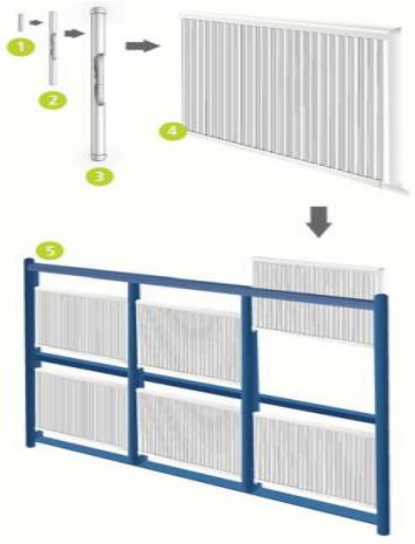


Figura 2: *Ejemplo de una Fuente de irradiación gamma*

Se definen cuatro categorías de irradiadores en base a las características de accesibilidad y a la modalidad de blindaje:

- Categoría I: autoblindada, almacenaje de la fuente en seco (ej. Gammacell). No es posible el acceso de personas a la fuente ni al área donde se realiza el proceso en ningún momento. (figura 3-A)
- Categoría II: panorámica, almacenaje de fuente en seco. No se puede acceder al área donde se realiza el proceso cuando la fuente está expuesta.
- Categoría III: autoblindada, almacenaje de la fuente en agua. La fuente está blindada –por agua- en todo momento, por lo que el acceso al área donde se realiza el proceso no es físicamente posible.

- Categoría IV: panorámica, almacenaje de la fuente en agua. No se puede acceder al área donde se realiza el proceso cuando la fuente está expuesta, y cuando no lo está, permanece blindada por agua. (Figura 3-B)

En Argentina se dispone de irradiadores Categoría I y IV, cuyos esquemas se muestran en la Figura 1:

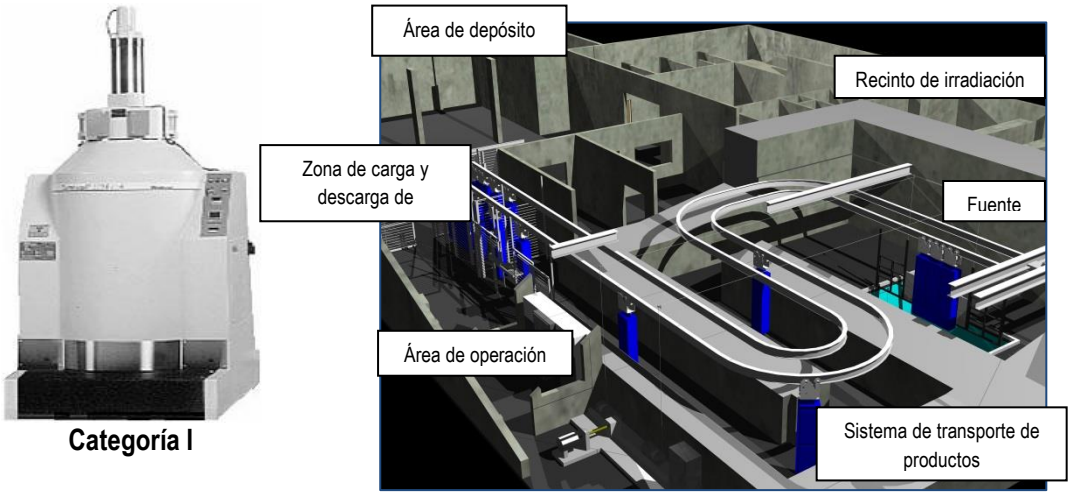


Figura 3: *ejemplos de Irradiadores: A- Categoría I (Gammacel 220, Nordion, CA) y B-Categoría IV (esquema de diseño de la Planta Semi-Industrial de CNEA, Ezeiza)*

El irradiador categoría I es autoblindado, lo que le permite estar en un laboratorio. La celda de irradiación en general es pequeña, no superando en muchos casos los 20 litros de capacidad. Se utilizan mayormente para actividades de investigación y desarrollo.

Las instalaciones de irradiación categoría IV de Argentina son multipropósito (tratan una gran diversidad de productos con distintos objetivos). Las mismas cuentan con una *fuente* de ^{60}Co (Actividad nominal máxima para la cual fueron construidas: 1 a 1,5 MCi), la cual en posición de reposo está sumergida en una pileta con agua desmineralizada con profundidad suficiente (generalmente 6 metros profundidad) para proteger al personal que deba ingresa al área de irradiación. Cuando se realiza el proceso irradiación, dicha fuente es izada mediante un mecanismo de movimiento adecuado. El *recinto de irradiación* es el local de la instalación destinado a la irradiación, con suficiente blindaje para limitar adecuadamente la dosis al interior del mismo, de modo de proteger tanto al personal que trabaja en la instalación como a miembros del público. El material que lo constituye y su espesor dependen de las características de la fuente, siendo en la mayoría de las veces hormigón armado. El producto a irradiar es colocado en *sistemas de transporte*, los cuales pueden ser de movimiento continuo o por tandas, simple o multipasadas frente a la fuente, o sistemas estáticos. Las características y capacidad del sistema de transporte son diseñadas de acuerdo al tipo y dimensiones del producto a irradiar. Generalmente los irradiadores se diferencian entre sí por el tipo de fuente y la geometría fuente-producto. La configuración debe ser tal que se optimice la uniformidad de dosis y la eficiencia del proceso. Se define el factor de eficiencia como la cantidad de energía ionizante absorbida en el producto por energía de radiación emitida desde la fuente.

En irradiadores gamma, por lo general, la uniformidad de dosis y la eficiencia son antagonistas. Por ejemplo, aumentando la distancia fuente-producto aumenta la uniformidad de dosis, pero reduce la eficiencia. En el caso en que el producto sobrepase la fuente, la eficiencia es más alta que en el caso que la fuente sobrepase al producto, pero la uniformidad de dosis es menor, por lo que en esta configuración es necesario realizar transferencia vertical del producto.

Máquinas generadoras de haces de electrones: La radiación primaria de los haces de electrones provienen de electrones acelerados producidos en máquinas, los cuales, a través de arreglos adecuados del equipo son organizados en un haz unidireccional dirigido hacia el producto. Los electrones emitidos por los aceleradores tienen un espectro de energía relativamente cercano (energías de hasta 10MeV, dependiendo de la potencia de la máquina) el cual define la penetración en el medio absorbente. La uniformidad de dosis sólo puede lograrse

mediante la correcta armonización de la frecuencia de barrido del haz, grado de repeticiones y velocidad del transportador.

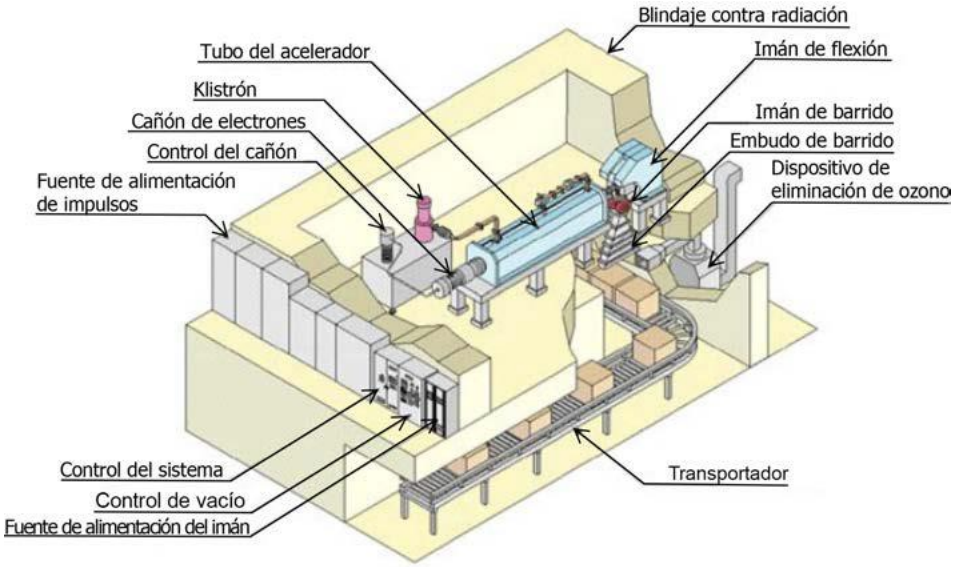


Figura 4: *Ejemplo de una instalación por haces de electrones acelerados (Manual de Buenas Prácticas para la irradiación de alimentos, OIEA Informe técnico 481, 2017)*

Máquinas generadoras de rayos X: Los rayos X son obtenidos por la conversión de la energía de los electrones acelerados que impactan sobre un blanco adecuado (tungsteno, tantalio u oro). Esto genera una reacción de frenamiento donde parte de la energía cinética se convierte en fotones (radiación de frenado o *bremsstrahlung*). La energía restante se transforma en calor. El material del convertidor, su espesor y su geometría afectan a la eficiencia de la conversión. A altas energías los rayos X son mayormente dirigidos hacia delante en la dirección de los electrones incidentes. En contraste a las fuentes de radionucleídos, los irradiadores de rayos X emiten un espectro de ancha banda, consistente en fotones de numerosas energías. En ciertos diseños la porción del espectro de baja energía puede ser filtrada, usando sólo las altas energías(energías de 0,2 a 5 Mev). Normalmente las máquinas generadoras de haces de electrones y de rayos X están provistas de un barredor de haz o de un dispositivo de dispersión a fin de conseguir una distribución uniforme de la radiación sobre la superficie del producto. Para lograr un proceso uniforme se deben ajustar el sistema de movimiento del producto, el ancho, la velocidad de barrido y la frecuencia de los impulsos del haz.

En Argentina, es la AUTORIDAD REGULATORIA NUCLEAR (ARN) el organismo que regula la actividad nuclear y tiene a su cargo el otorgamiento de autorizaciones y licencias tanto para la construcción, la licencia de operación de la instalación y las licencias específicas del personal que ocupa los puestos críticos tales como jefe de instalación, responsable primario, jefe de operadores, operadores y oficial de radioprotección. Las autoridades sanitarias correspondientes a la jurisdicción donde se emplaza la instalación serán las encargadas de habilitar la instalación para el fin que deben cumplir, como ser esterilización o irradiación de alimentos.

Efecto de las radiaciones sobre los microorganismos

La interacción de la radiación con la materia depende del tipo de radiación y su energía, la composición, estado físico y temperatura del material absorbente, y otros factores tales como la velocidad en que se entrega la energía y las condiciones ambientales.

Hay tres etapas fundamentales en el proceso de interacción de la radiación ionizante con el material absorbente (incluidos los microorganismos):

1) Proceso físico: involucra la interacción de la radiación con la materia, produciendo ionización y excitación;
2) Proceso químico: involucra los cambios químicos que se producen como consecuencia de las especies moleculares formadas en el proceso físico, que tienden a reaccionar en cadena con las moléculas vecinas. Dichas especies altamente reactivas van a seguir reaccionando hasta estabilizarse; el tiempo

que transcurre desde la transferencia de energía al absorbente hasta la estabilidad de las especies moleculares es del orden de 10^{-3} segundos. Dicha cadena de reacciones será mayor si las especies moleculares pueden difundir en el medio (por ejemplo, si el absorbente está en estado líquido) o quedarán limitadas si el medio no lo permite (por ejemplo, si el absorbente está en estado sólido).

3) Proceso biológico: involucra los cambios químicos producidos en los componentes celulares, los cuales pueden tener consecuencias en las actividades de la célula y, dependiendo de la seriedad del daño, la muerte del organismo.

A su vez, hay dos formas en que se producen las modificaciones, mediante el *efecto directo*, relacionado con el proceso físico de interacción de la radiación con el blanco de interés (ionización y excitación) e *indirecto*, especies moleculares formadas en el entorno y que van a interactuar con el blanco de interés afectándolo de alguna manera.

Acción sobre la molécula de ADN

El efecto letal de la radiación sobre las células es atribuible, en principio, a la deposición de la energía (efecto directo) en estructuras críticas o blancos.

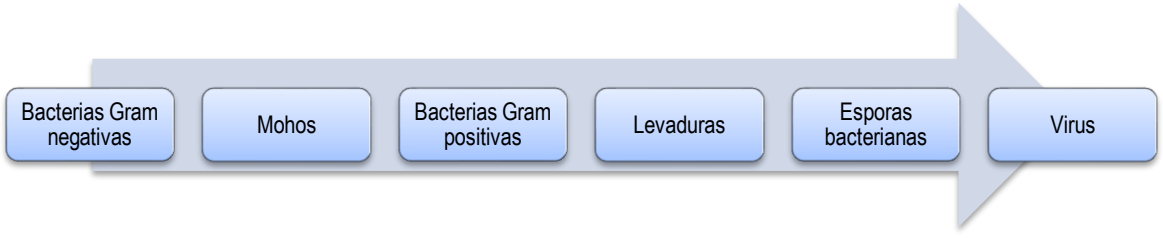
Se han considerado los siguientes mecanismos posibles de acción de la radiación sobre la célula microbiana:

- Cambios en la estructura y composición del ADN celular, los que pueden afectar el normal funcionamiento celular, incluyendo la reproducción celular.
- Alteración de la membrana celular. Afectan su función de transportar sustancias críticas para la actividad celular y el de la replicación del ADN (muchas de las enzimas requeridas para reparar el ADN están localizadas en la membrana).
- Efectos sobre los procesos de síntesis, particularmente de las moléculas de ADN y ARN.
- Efectos sobre enzimas.
- Efectos sobre el metabolismo energético a través de la reducción de la fosforilación.

De todos estos cambios, los considerados de mayor relevancia son los del ADN celular, debido al rol que juega en la división celular, la presencia de una sola molécula de ADN por célula, a su gran tamaño en comparación con otras moléculas de la célula y a su complejidad estructural.

Algunas células tienen capacidad intrínseca de reparación del daño celular, resultando ellas tener mayor resistencia a la radiación. Las bacterias que son capaces de reparar rupturas de doble cadena de ADN son más resistentes que aquellas que reparan solamente la ruptura de una sola cadena.

La dosis letal varía con el organismo y disminuye con el incremento de la complejidad y tamaño del organismo. En general, la resistencia que los microorganismos presentan a la radiación tiene el siguiente orden:



El efecto que la radiación produce en las células se genera por dos mecanismos, llamados *acción directa* e *indirecta (Figura 5)*. En vista de esto, los factores ambientales, tales como temperatura, composición del medio, presiones parciales de gases disueltas o en contacto con el producto, agentes protectores, pueden cambiar radicalmente el efecto de la radiación.

En los sistemas biológicos la influencia de la acción indirecta de las radiaciones ionizantes (alrededor del 66%) puede traducirse en diferentes efectos, por ejemplo se observa disminución de la resistencia de un organismo al aumentar la temperatura (efecto sinérgico) o una mayor resistencia cuando se mantiene congelado el sistema durante la irradiación. En este último caso la acción indirecta es minimizada, ya que las especies moleculares

formadas no pueden difundir. Asímismo, cuando se irradia un sistema biológico en presencia de sustancias que tienen una alta reactividad con los radicales libres, se traduce en un efecto radioprotector (por ejemplo, un protector de la acción indirecta de los radicales hidroxilos formados en la radiólisis del agua es la glicerina).

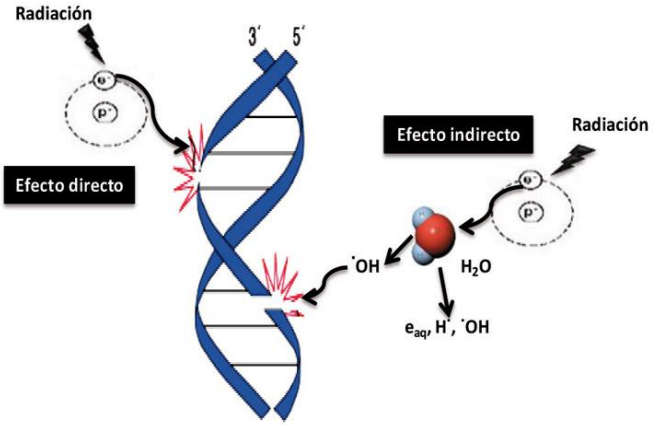


Figura 6:

Efecto directo: resulta de la energía absorbida directamente por el ADN

Efecto indirecto: es el resultante de la absorción de la energía en el medio, y la difusión de las especies moleculares formadas en ese entorno que van a reaccionar con el ADN

(Fuente: https://seguridadypromociondelasalud.fundacionmapfre.org/n134/es/articulo2.html)

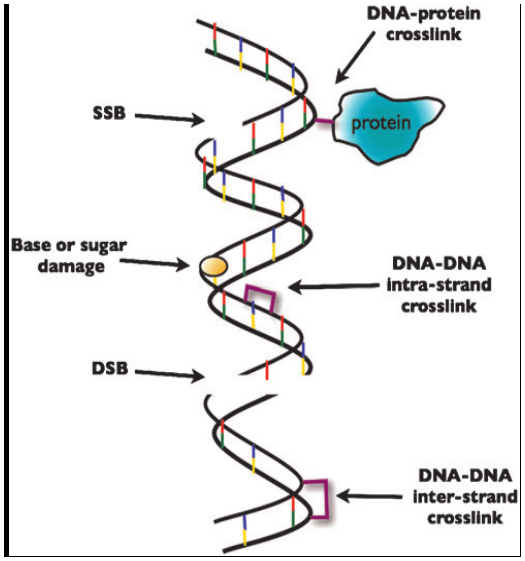
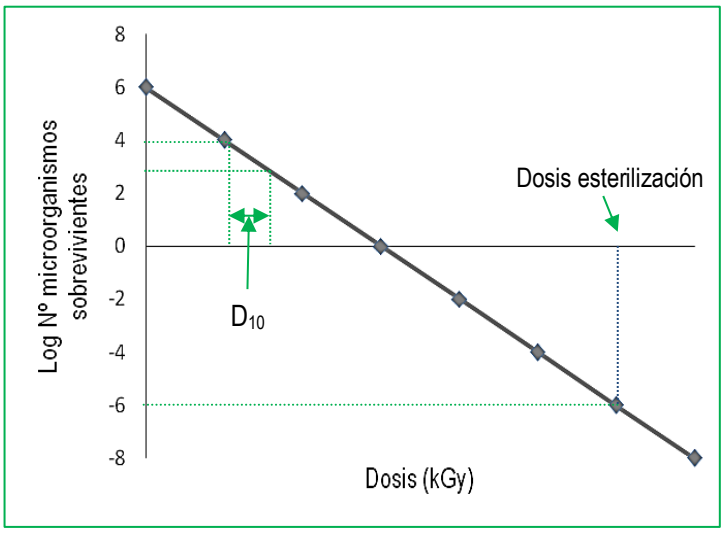


Figura 5*: Representación esquemática de las alteraciones radioinducidas en la doble cadena del ADN (https://www.researchgate.net/publication/234120924)*

Curvas de inactivación:

Si se irradia una población de células acondicionadas en un determinado medio con dosis crecientes y se grafica el logaritmo del número de sobrevivientes en función de la dosis se obtiene una curva de cinética de primer orden

con pendiente negativa. La pendiente de la curva refleja la sensibilidad del microorganismo a la radiación, en las condiciones de tratamiento. Cuando esta población de células pertenece a un tipo de microorganismo, el valor inverso de la pendiente de la curva de inactivación es el D_{10}, que se puede calcular experimentalmente a partir de la curva de inactivación (Figura 7).



Ecuación de la curva:

$$Log\ N = log\ N_0 - k\ D$$

Donde $k = 1/D_{10}$

$D_{10} = 1/k$

Figura 7: *Curva de inactivación*

El valor D_{10} se define como la dosis necesaria para reducir el 90% de una población homogénea de microorganismos en un entorno definido (expresado en Gray o kGy).

En los siguientes gráficos, Figuras 8 y 9, se puede observar la dependencia de la dosis de esterilización con el número inicial de microorganismos (carga microbiana en el producto) y del tipo de microorganismos o condición de irradiación.

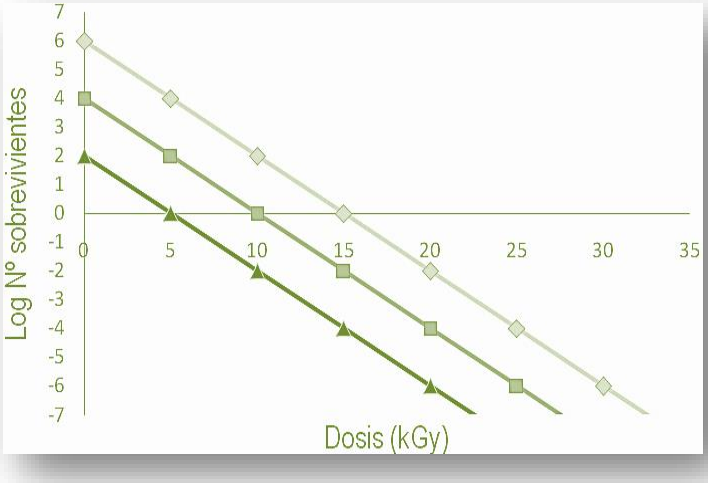


Figura 8*: Curvas correspondientes a diferente carga microbiana inicial pertenecientes a un mismo tipo de microorganismo irradiado en la misma condición ambiental.*

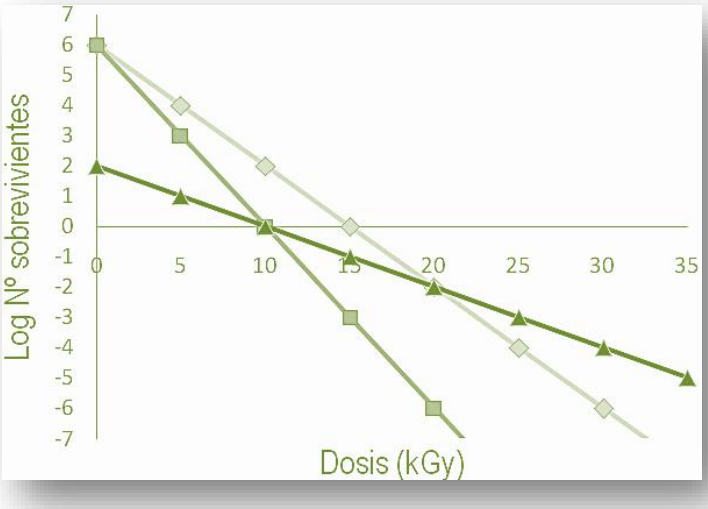


***Figura 9**: Curvas correspondientes a diferentes microorganismos o a un mismo microorganismo pero en diferentes condiciones de conservación e irradiación (por ejemplo, congelado, deshidratado, en solución acuosa, etc.)*

Efectos de la radiación en los materiales

Cuando un producto es irradiado con radiación ionizante, sea radiación gamma o haces de electrones, las reacciones se producen a nivel de electrones orbitales, dando lugar a reacciones químicas cuando la energía absorbida no puede ser disipada por el material antes de llegar a la ruptura de enlaces.

En materiales como los **metales**, los niveles de dosis empleados en los procesos de esterilización no provocan reacciones químicas ya que por el tipo de uniones que los constituyen la energía se disipa fácilmente como calor o energía cinética.

Los **vidrios** también tienen estructuras que permiten la disipación de la energía, en este caso la coloración es un resultado habitual de la irradiación porque los electrones separados de sus órbitas pueden quedar atrapados en fallas de la estructura del vidrio generando centros de color. En general se produce un color ámbar o caramelo, según la dosis absorbida y la composición del vidrio. Este efecto en vidrios es utilizado en la modificación de colores de piedras semipreciosas y, en algunos países, de perlas cultivadas. Desde el punto de vista del proceso de radioesterilización, la coloración sólo sería un impedimento en el caso de requerirse transparencia total y ausencia de color. El fenómeno es reversible ya que a medida que decae la excitación de los electrones, el vidrio retorna a su color inicial en un proceso que se puede acelerar por calentamiento. En cuanto a otras propiedades, no se detectan cambios para los niveles de dosis considerados.

El efecto de la radiación para un mismo **polímero** genérico varía con las condiciones de la irradiación, la geometría del producto, la historia térmica en el procesado del producto (que da lugar a distintos tipos morfológicos o de cristalinidad), y los aditivos incluidos en el polímero. La presencia de estabilizantes y cargas inertes puede mejorar significativamente la tolerancia a la radiación de muchos plásticos. Se utilizan por ejemplo derivados de ácidos grasos de Ca, Mg, Zn o Ba; aminas o fenoles sustituidos; compuestos organometálicos del tipo octil-Sn; ésteres del ácido tiodipropanoico; derivados de fosfitos.

El problema de la estabilización es particularmente importante en los casos del **polipropileno** y del **PVC** por tratarse de materiales muy empleados en productos médicos y envases y que, por diferentes razones, están en el umbral de dosis máxima cuando se esteriliza por radiaciones.

Por eso es importante determinar al comienzo del proceso cuáles son las propiedades que afectan críticamente el desempeño del producto y qué grado de alteración es aceptable.

Los principales efectos en las propiedades físicas de polímeros sometidos a irradiación son: el *entrecruzamiento*, cuando predomina la ruptura de uniones de grupos de las cadenas laterales con formación de nuevos enlaces laterales, y la *degradación*, cuando predomina la ruptura de uniones de las cadenas principales. En la Tabla 2 se resume el efecto de la radiación en las propiedades físicas.

Tabla 2. *Efecto de la radiación en las propiedades físicas.*

	Peso Molecular	Flexibilidad	Solubilidad	Fusibilidad
Entrecruzamiento	Aumenta	Disminuye	Disminuye	Disminuye
Degradación	Disminuye	Disminuye	Aumenta	Aumenta

Existen diversas tablas de radioresistencia de polímeros[7] que normalmente presentan la dosis de tolerancia. Estos valores deben tomarse sólo a título indicativo ya que han sido determinados para alguna propiedad particular, en condiciones de irradiación que pueden ser diferentes de las de interés. Ver Tabla 3.

Tabla 3. *Niveles de tolerancia a la radiación de algunos polímeros usados en productos médicos, clasificados de acuerdo a sus propiedades y usos finales*

Material	Nivel de tolerancia (kGy) varía según composición, historia térmica o aditivos
Elastómeros *(aquellos que se deforman al someterlos a un esfuerzo, pero recuperan su forma inicial)*	
Goma butilo	50
Goma natural	100
Acrílico	50 – 200
Neoprene	200
Siliconas	50 – 100
Termoestables *(presentan muchos entrecruzamientos en su estructura molecular)*	
Poliésteres	10 – 1.000
Epoxis	1.000
Fenólicos	50.000
Poliuretanos	100 – 1.000
Termoplásticos *(presentan pocos o ningún entrecruzamiento en su estructura molecular)*	
ABS (acrilonitrilo/butadieno/estireno)	1.000
PET (poliéster aromático)	1.000
Papel, fibras corrugadas	100 – 200
Celulosa, acetato, butirato	50
PTFE (Teflón)	5
Poliamidas (Nylon)	50 – 10.000
Policarbonato	1.000
Polietileno (todas las densidades)	1.000
Poliamidas	10.000
Poliestireno	10.000
Polisulfona	10.000
Polipropileno estabilizado	20 – 60
PVC	100

De acuerdo a la funcionalidad que debe cumplir el polímero en el producto, se pueden realizar distintos ensayos[8], teniendo en cuenta el efecto de la irradiación pero también el tiempo que debe durar el producto o componente de interés por ejemplo:

- Para exigencia mecánica: Materiales flexibles: tracción, flexión o punción, según la geometría de las muestras; y Materiales rígidos: flexión, compresión

- Para coloración: visual contra testigo, medición de color, espectrometría
- Químicos: según metodología de control del fabricante

Definición de producto, proceso y Validación de la irradiación

Cada fabricante deberá incluir el proceso de esterilización o descontaminación en su programa de producción, cumpliendo con los requerimientos de las Buenas Prácticas de Fabricación. El fabricante del producto es responsable de la calidad del mismo, incluyendo la selección de la dosis apropiada para lograr el objetivo y la funcionalidad del producto final. Cabe destacar que las instalaciones prestadoras del servicio son responsables de entregar la dosis de irradiación solicitada, no del objetivo buscado con dicha irradiación. La norma utilizada internacionalmente para la definición de los Requisitos de desarrollo, validación y control de rutina del proceso de irradiación es la ISO 11137. Dicha norma técnica puede encuadrarse con las Normas de Gestión tales como la ISO 13485 o la ISO 9001.

Para asegurar la calidad del producto irradiado, se deben seguir las etapas descriptas en la Figura 1, donde:

1. **Definición del producto**: Se identifica y caracteriza el producto, componente o materia prima y la etapa en la cual es más conveniente que sea irradiado. Es recomendable analizar este punto en base a la gestión de riesgos para obtener el producto terminado que mejor cumpla los requisitos de calidad.
2. **Definición del proceso**: Se determina experimentalmente la dosis de esterilización o descontaminación (dosis mínima) y se establece la dosis de tolerancia, demostrando que el producto no se modifica significativamente durante toda su vida útil (dosis máxima). En esta etapa y en la de definición del producto se puede evaluar cómo proteger al producto o componente en caso que se requiera.

2.1. Establecimiento de la dosis mínima de tratamiento

2.1.1. Determinación de la dosis de esterilización

En la Resolución Nro. 255/94[4] del Ministerio de Salud y Acción Social de la República Argentina se establecen las condiciones para los procedimientos de esterilización. Para cumplimentar con los requerimientos que establece esta norma en lo que respecta a asegurar que un producto alcance un nivel de seguridad de esterilidad de 10^{-6}, se debe determinar la dosis mínima del proceso de esterilización para alcanzar tal objetivo. Para ello se debe recurrir a métodos validados.

Métodos de determinación de la dosis de esterilización

Los métodos para la determinación de la dosis de esterilización derivan del modelo de inactivación de la población microbiana del producto en su estado natural cuando es expuesta a la irradiación.

Estos métodos están basados sobre el modelo probabilístico constituido por una mezcla de varias especies microbianas, y donde la probabilidad que un producto en particular sea estéril (es decir que alcanza el nivel de seguridad de esterilidad de 10^{-6}) después de haber sido expuesto a una dada dosis de irradiación, está definido en términos del número inicial de microorganismos presentes en la unidad de producto previo a la irradiación y de sus valores de D_{10}.

En el gráfico de la Figura 10, se observa una serie de curvas pertenecientes a diferentes números iniciales y tipos de organismos, cada uno con su pendiente particular, resultando una curva total no lineal llamada Distribución Estándar de Resistencias (DER). A partir de ella se puede deducir que, para una carga microbiana inicial de 1000 UFC, con 25 kGy (2,5 MRad) se alcanza el nivel de seguridad de esterilidad de 10^{-6} (1/1.000.000). De esta manera se puede evidenciar que dicha dosis, tradicionalmente considerada como dosis mínima de esterilización, no asevera racionalmente que el producto tratado haya recibido la efectiva dosis de esterilización sino se realizan los ensayos de determinación de carga microbiana y verificación de la radiosensibilidad. Puede darse que la carga microbiana sea mayor a 1000 UFC/ producto, o que la radioresistencia de los microorganismos presentes en el producto sea mayor.

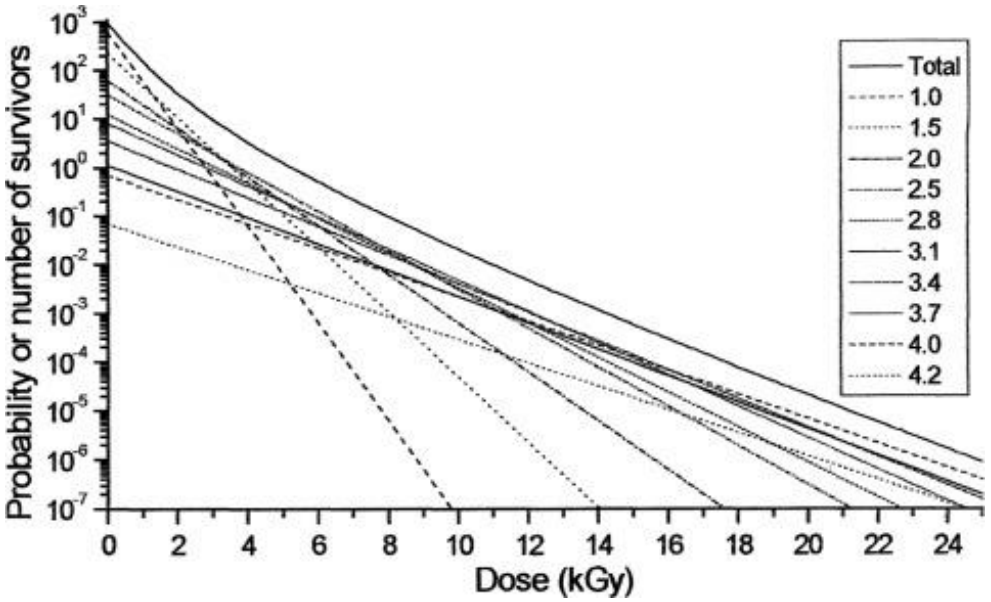


***Figura 10**: Curvas de inactivación de microorganismos heterogéneos de Whitby & Gelda, (W/G) (1979) y la tabla de distribución de D_{10} para 1000 microorganismos.*

Métodos según la Norma ISO 11137:2013, parte 2 y la especificación técnica ISO/TS 13004:2013:

Los métodos descriptos en ambos documentos pueden ser seleccionados de acuerdo a dos enfoques:

a) Determinación de la dosis para obtener una dosis específica para el producto: Métodos 1 y 2

b) Convalidación de dosis para verificar una dosis pre-seleccionada de 25 kGy o 15 kGy: Método VD_{max}

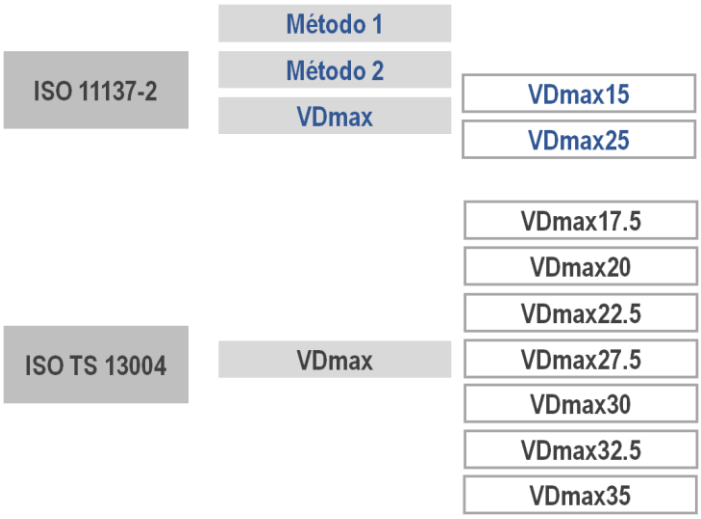


***Figura 11:** Esquema donde se resumen los métodos de selección de dosis*

El M*étodo 1* se usa para determinar la menor dosis necesaria de esterilización para la carga microbiana determinada. Este método puede ser usado cuando se desea la menor dosis de esterilización posible por razones de costos de irradiación, cuando hay materiales sensibles a la radiación o cuando la carga microbiana es mayor a 1000 UFC por producto. La desventaja es que requiere un alto número de muestras.

El M*étodo 2* usa los datos derivados de la inactivación de la población microbiana en su estado natural como se presentan en el producto. Involucra la realización de ensayos de esterilidad en las unidades de producto

que han recibido dosis de esterilización crecientes sucesivas por debajo de la dosis de esterilización. Los resultados de estos ensayos son usados para predecir la dosis necesaria para alcanzar un nivel de seguridad de esterilidad predeterminado. Requiere un número de muestras muy elevado, superior al Método 1, aunque es recomendable para poblaciones microbianas donde se desconoce su D_{10} por las condiciones del producto (cuando no fueron determinados previamente).

El M*étodo VD_{max}* es indicativo de la convalidación de una dosis de esterilización preseleccionada. Requiere un número bajo de muestras, lo cual es conveniente cuando son lotes pequeños de producción, o cuando los productos son muy costosos. Existen varias alternativas que van desde VD_{max}^{15} a VD_{max}^{35}. El método pre-seleccionado dependerá de la carga microbiana máxima que puede estar presente en la unidad de producto, que va desde menos de1,5 UFC por producto para el VD_{max}^{15} y 440.000 UFC para el VD_{max}^{35}.

En el método VD_{max} se calcula la máxima dosis de verificación posible para el producto para reducir el riesgo de falla debido al bajo número de muestras.

La determinación de dosis mínima por cualquiera de los métodos mencionados se debe realizar sobre muestras obtenidas de 3 lotes, cuando son producciones frecuentes y en este caso, mientras no se cambie ninguna etapa del proceso que pueda influir en la carga microbiana, la dosis determinada sigue siendo válida para lotes posteriores de producción. Periódicamente se deben realizar auditorías de validez de la dosis, como mantenimiento de la validación. Se realiza sobre 1 lote de producción cuando éste sea único o infrecuente. En este caso, la dosis es válida solo para dicho lote.

Los requerimientos técnicos básicos para generar la información requerida para la selección de la dosis de esterilización utilizando cualquiera de los mencionados métodos son[1]:

a. El producto a ser sometido al proceso de esterilización debe estar fabricado bajo las Buenas Prácticas de Fabricación para asegurar una producción uniforme y controlada del mismo.

b. Tener acceso a los servicios de un laboratorio de microbiología y materiales

c. Los ensayos microbiológicos para la determinación de la carga microbiana del producto y los de esterilidad, como parte de estos métodos, deberán ser realizados de acuerdo a las normas ISO 11737 parte 1 y 2 respectivamente. Las metodologías de análisis microbiológico deben validarse determinando el factor de recuperación.

d. Tener acceso a instalaciones o equipos que entreguen dosis desde <1 kGy, pudiendo ser:

   - Fuentes de radiación de ^{60}Co o de ^{137}Cs
   - Irradiadores de haces de electrones o rayos-X.

   Se debe tener en cuenta que los niveles energía y tasa de dosis de estos equipos sean similares a aquellos que serán usados en el proceso de esterilización del lote correspondiente del producto.

Consideraciones generales para los ensayos de determinación de la dosis de esterilización:

- Las muestras de producto deben ser representativas de la totalidad del lote fabricado.
- Realizar los ensayos de carga microbiana inicial y verificación de dosis con el producto terminado o como se acondicione, previo al proceso de irradiación
- Se debe tener en cuenta que la presencia de un alto número bacterias Gram negativas puede significar presencia de endotoxinas bacterianas, y estas son altamente resistentes a las radiaciones.
- En el caso de juegos de producto que contiene múltiples dispositivos del mismo producto dentro de un único envase, se considera cada uno como unidad de producto.
- Cuando contienen múltiples productos, se considera cada producto individualmente.
- Cuando se irradien las muestras con la dosis de verificación calculada de debe tener en cuenta, que se entrega con una dispersión no mayor del ±10% respecto de la dosis solicitada.
- Tanto en el recuento de la carga microbiana inicial como en la irradiación de las muestras para el ensayo de verificación de la dosis de esterilización puede realizarse con la unidad del producto en su envase original o con porciones normalizadas del producto, preferentemente en su envase original. En el caso

de usarse una porción normalizada de producto (cuando el producto es muy grande o el lote de producción es muy pequeño) debe estar demostrada que la porción elegida de muestra es la adecuada[2]

- El acondicionamiento de las muestras, para la irradiación con la dosis de verificación, debe realizarse en acuerdo con el laboratorio de irradiación/dosimetría.
- La condición de irradiación de las muestras con la dosis de verificación debe ser la misma que la del proceso de irradiación de la totalidad del lote de producción.
-

2.1.2. Determinación de la dosis de descontaminación

Para determinar la dosis de descontaminación, no existe métodos definidos como los de las Normas antes mencionadas. Por esta razón, una estrategia es diseñar una curva dosis respuesta, eligiendo un intervalo de dosis incrementales donde se pueda cuantificar los microorganismos contaminantes, y utilizando como metodología analítica la descripta por las Resoluciones o Farmacopeas correspondientes, ya sea para el recuento como para las investigaciones.

Esta tecnología correctamente implementada permite asegurar la reducción a los límites microbiológicos que se requieran, así como la ausencia de determinados microorganismos objetables en la cantidad de producto que debe considerarse (por ejemplo, ausencia en 1 gramo o 10 gramos). Es importante conocer o estimar la resistencia de estos microrganismos en la matriz de interés, y en la condición en la cual se irradiará. Estos son factores importantes ya que influyen directamente en la eficacia del tratamiento. Sirven como referencia de esta influencia las Figuras 8 y 9 antes mostradas.

Las dosis mínimas de descontaminación pueden encontrarse entre 2 a 10 kGy generalmente, dependiendo de la carga microbiana, resistencia de los microorganismos contaminantes, y requerimiento final que se debe alcanzar.

2.2. Determinación de la dosis máxima compatible:

Una guía para este proceso consiste en la realización de un estudio que incluya la selección del o los materiales de envase y producto, tomando en consideración la información disponible sobre la tolerancia a la radiación de los distintos materiales.

Se irradian muestras del material seleccionado con dosis que cubran el rango de tratamiento del producto, con márgenes adecuados. Conociendo el factor de homogeneidad de dosis de la instalación donde se realizará la esterilización, se puede calcular cuál es la máxima dosis (D_{max}) que recibe parte de los productos cuando se irradian para lograr la dosis mínima de esterilización (D_{min}). La D_{max}, es la mínima dosis que se debe aplicar a las muestras de productos y envases durante la evaluación de la compatibilidad de materiales. Sin embargo, es conveniente contar con un margen de operación más amplio, para lo cual se recomienda irradiar muestras con dosis crecientes, por ejemplo hasta 70 kGy, de modo de establecer cuál es la dosis máxima que puede aplicarse con seguridad de no afectar la funcionalidad o estabilidad del producto.

Las propiedades a estudiar dependen del tipo de producto, de la función que debe cumplir y de la clase de material. Por lo general se requiere realizar ensayos de las propiedades mecánicas (especialmente en productos médicos, envases, insumos de laboratorio), aunque en ocasiones otras propiedades como la coloración o estabilidad de un principio activo pueden ser determinantes en cuanto a la compatibilidad con el tratamiento. Todos los ensayos deben realizarse a tiempo 0 (inmediatamente post-irradiación) y también durante la vida útil prevista para el producto, lo cual se puede llevar a cabo mediante ensayos de envejecimiento acelerado.

Se efectúan ensayos de las propiedades elegidas tomando como referencia las muestras no irradiadas para establecer el grado de deterioro, si lo hay, causado por cada dosis aplicada. La dosis máxima que podrá aplicarse al producto será aquella para la cual no se ha detectado deterioro en las propiedades consideradas críticas, o bien el deterioro experimentado es menor o igual al máximo aceptable para que no se afecte la funcionalidad del producto. En la Tabla 4 se muestran algunos ejemplos de ensayos que se pueden realizar para evaluar funcionalidad:

Tabla 4: *Ensayos funcionales de acuerdo al uso final*

Para fragilidad	• Mecánicos (tracción, flexión, impacto, dureza, compresión, desgarro)
Para coloración:	• índice de amarilleo • espectrometría óptica • medición de color
Hermeticidad	• Estanqueidad del envase primario o secundario
Para biocompatibilidad:	• compatibilidad con linfocitos • reactividad intracutánea • cultivo de tejidos

3) Validación de la Irradiación

Se recomienda seguir los lineamientos de la norma ISO 11137:2006 para Esterilización de productos para el cuidado de la salud – Requerimientos para validación y control de rutina – Esterilización por radiación.

La Norma incluye los siguientes elementos:

1. Calificación de la instalación
2. Calificación de Operación
3. Calificación de Performance
4. Verificación y aprobación de los elementos anteriores
5. Mantenimiento de la validación

1. Calificación de la Instalación

La **calificación de la instalación** tiene por objeto demostrar que el irradiador y sistemas auxiliares han sido instalados y operan de acuerdo a su especificación. *Esta etapa es responsabilidad del irradiador*. El fabricante podrá auditar que ha sido cumplimentada.

La misma incluye:

- *Documentación de la Planta* (especificaciones, características y descripción del irradiador, del sistema de transporte, procedimientos de operación, modificaciones realizadas, etc.).
- *Definición de los parámetros críticos del proceso*: Para *plantas gamma* los parámetros críticos son el tiempo de exposición, tiempo por posición, velocidad del sistema de transporte, temporizadores y mediciones de dosis. En instalaciones con *aceleradores de electrones y rayos X*, los parámetros deben incluir las características del acelerador (corriente promedio, energía de los electrones, ancho de barrido), velocidad del sistema de transporte y mediciones de dosis.
- *Plan y manual de Mantenimiento Anual*, programa de pruebas periódicas para verificar el correcto funcionamiento de los sistemas.
- *Plan de calibración* para asegurar que los equipos y sistema dosimétricos son trazables a estándares o referencias nacionales.

2. Calificación de Operación

La calificación de Operación tiene por objeto demostrar que el irradiador instalado es capaz de operar -de acuerdo con sus procedimientos operativos- y de entregar dosis apropiadas dentro del criterio de aceptación definido. *Esta etapa es responsabilidad del irradiador*. El fabricante podrá auditar que ha sido cumplimentada.

La caracterización del irradiador (en lo que respecta a la magnitud, distribución y reproducibilidad de la dosis entregada, se realiza mediante mapeo de dosis sin carga de producto (irradiación *en aire*) y/o con producto simulado con elementos de características similares a productos reales a diferentes tasas de dosis en condiciones

reales de irradiación. Para ello se colocan dosímetros en múltiples posiciones para determinar la distribución de dosis en el producto

Para *plantas gamma y de rayos X* se realizan mapeos de dosis en aire o con producto simulado. En *aceleradores de electrones* el mapeo de dosis es realizado con producto simulado -material de densidad homogéneo- no sólo caracteriza la distribución de dosis sobre el volumen utilizado para la irradiación del producto transportado a través del campo de radiación, sino que establece la relación entre la dosis y su distribución respecto a los parámetros de operación del acelerador sobre los límites operacionales encontrados en la irradiación de productos.

3. Calificación de Performance

La **calificación de performance** utiliza producto real para demostrar que el irradiador opera de acuerdo a criterios predeterminados y que el resultado del proceso satisface los requisitos especificados. Para realizar este paso es necesario conocer previamente las características del producto y rango de dosis especificados por el cliente (según los resultados obtenidos en la definición de producto y de proceso).

La calificación de performance implica la determinación del patrón de carga y mapeo de dosis del producto en su embalaje. *Esta etapa es responsabilidad del irradiador en conjunto con el fabricante*.

3.1 Determinación del Patrón de Carga

Se debe establecer el patrón de carga para cada tipo de producto. La especificación del mismo debe documentar:

En *plantas gamma y de rayos X*

- Descripción del producto en su embalaje y su orientación dentro del mismo, incluyendo dimensiones, peso y densidad, y variaciones aceptables de ésta última
- Descripción de la disposición de los bultos en el dispositivo de irradiación
- Descripción del dispositivo de irradiación y sus dimensiones

En *aceleradores de electrones*:

- Descripción del producto en su embalaje y su orientación dentro del mismo, incluyendo dimensiones, peso y densidad, y variaciones aceptables de ésta última
- Orientación del producto respecto a la dirección del movimiento del sistema de transporte y el haz de electrones
- Descripción de la disposición de los bultos en el dispositivo de irradiación
- Descripción del dispositivo de irradiación y sus dimensiones

3.2 . Mapeo de Dosis en el Producto

El mismo permite conocer la distribución de la dosis -para un tiempo determinado- en todo el volumen del producto para el patrón de carga establecido y asegurar la reproducibilidad del proceso. La información obtenida se utilizará posteriormente para determinar las posiciones de monitoreo de dosis en el proceso de rutina.

Para realizar un mapeo de dosis, se distribuyen dosímetros en puntos estratégicos del volumen, los cuales se eligen de acuerdo a antecedentes y en base a la posición relativa producto-fuente. Se realiza para un número de dispositivos de irradiación -representativo de la condición real de irradiación- suficiente para determinar la variación de la dosis absorbida entre los mismos.

Una vez finalizado el mapeo de dosis se evalúa si la uniformidad de dosis resultante es compatible con las especificaciones del proceso, o sea que se logra aplicarla dosis mínima solicitada por el cliente, y no se supera la dosis máxima admisible. En caso de no lograr cumplir con este rango de dosis, se puede modificar el patrón de carga, o reduciendo el tamaño de la caja del producto, tomando como referencia los resultados del mapeo inicial y se verifica dicho patrón mediante un nuevo mapeo. Asímismo, se deben realizar verificaciones posteriores en puntos estratégicos para garantizar la repetibilidad de los resultados obtenidos. **Si los resultados son aceptados, se tomarán como referencia en las irradiaciones de rutina.**

Del mapeo de dosis se obtiene la siguiente información:
- Identificación de la posición de los puntos de dosis mínima y máxima
- Relación de dosis entre posiciones de monitoreo de dosis de rutina y las de mínima y máxima
- La velocidad de dosis en distintos puntos
- La uniformidad de dosis ($D_{máx}$/ $D_{mín}$)

Se debe realizar un nuevo mapeo de dosis cuando:
- se altera el patrón de carga de un producto
- se procesan productos nuevos (diferentes características y/o densidad, empaques no convencionales)
- recalificaciones de proceso

4. Verificación y Aprobación de los Elementos Anteriores

Se realiza una revisión de toda la información obtenida en la calificación de la instalación y de proceso, para evaluar la factibilidad de satisfacer –en forma reproducible y dentro de las especificaciones- los requisitos establecidos, para proceder entonces a la aceptación del proceso de irradiación para determinado producto o categoría.

5. Mantenimiento de la Validación realizada

- Recalibración periódica de equipos, instrumentos y sistema dosimétrico
- Recalificación de la instalación toda vez que se producen cambios que puedan afectar la distribución de dosis (después de recarga o cambio en la configuración de la fuente, modificaciones de la geometría fuente-producto)
- Recalificación del proceso (modificación del patrón de carga en el dispositivo irradiación, cambio en densidad y/o orientación del producto, cuando se observa un cambio en la tendencia de los resultados en la dosimetría de rutina, etc.)
- Auditoria de la dosis de esterilización: La auditoría o control de la dosis se **r**ealiza periódicamente para confirmar la dosis de esterilización establecida para un producto médico específico. Para producciones regulares, se realiza una auditoria a intervalos de cada 3 meses con el objeto de detectar cambios cualitativos o cuantitativos de la carga microbiana que pudieran requerir un incremento de la dosis de esterilización. Cuando se introduce cambios en el proceso de producción se debe determinar la dosis de esterilización nuevamente.

Monitoreo y control de rutina

Una vez aprobados y verificados los elementos de la validación por parte de la instalación esterilizadora como por el fabricante del producto a ser esterilizado, se puede proceder a las irradiaciones de rutina.

A estos efectos, mientras no se cambie ninguna etapa del proceso e instalaciones que pueda influir en la calidad del producto, se aplicará la dosis mínima de esterilización determinada, evitando superar la dosis máxima tolerable, y en las mismas condiciones de irradiación. Se controlará cada lote de irradiación con dosímetros en los puntos de mínima y máxima predeterminados en la validación.

Conclusiones sobre el método

Las principales características del procesamiento por radiación son:

- Los productos pueden ser tratados en su embalaje final evitando riesgo de recontaminación posterior
- No hay aumento significativo de la temperatura de los productos, por lo que incluso pueden irradiarse productos congelados.
- La principal variable del proceso a controlar es la dosis
- No requiere tratamiento post-esterilización: una vez tratado el producto puede utilizarse inmediatamente, ya que no deja residuos.
- Su costo es competitivo respecto a métodos alternativos

- Es aplicable a productos a granel, ya que la energía es altamente penetrante
- Es una tecnología que no contamina el medioambiente
- Las instalaciones tienen alto nivel de seguridad y personal capacitado

Bibliografía

1. International Irradiation Association (www.iia.org.ar)
2. Resolución 255/94 del Ministerio de Salud.
3. ISO 11737 – 1:2006, Sterilization of medical devices – Microbiological methods – Part 1: Estimation of population of microorganisms on product.
4. ISO 11737 – 2:2009, Sterilization of medical devices – Microbiological methods – Part 2: Tests of sterility performed in the validation of a sterilization process.
5. ISO 11137-1:2006, Sterilization of health care products – Radiation – *Part 1 Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices*.
6. ISO 11137-2:2013, Sterilization of health care products – Radiation – Part 2: *Establishing the sterilization dose*
7. ISO 11137-3:2006, Sterilization of health care products – Radiation – Part 3: *Guidance on dosimetric aspects.*
8. ISO/TS 14003:2013, Sterilization of health care products —Radiation — Substantiation of selected sterilization dose: Method VDmaxSD
9. ISO 11607:97 envases para dispositivos médicos esterilizados en su envase final
10. AAMI/TIR 17 Lineamientos para la calificación de materiales de productos a ser esterilizados por radiación.

Capítulo II.2.C

Esterilización por Óxido de etileno

Gustavo Enriquez y Nora Carbone

Fundamentos y características del método

Equipamiento

Proceso

Residuales de óxido de etileno y derivados

Validación y control de ciclos de rutina

Recalificación

Liberación de la carga

Aplicación en productos médicos, incompatibilidades y limitaciones del método

Controversias y conclusiones

Bibliografía

Fundamentos y características del método

La esterilización por óxido de etileno (EO) es una metodología química a baja temperatura basada en la utilización de un gas altamente eficaz como agente esterilizante, permeable y difusible a través de empaques y productos [1,2]

A partir del advenimiento de los productos médicos descartables comienza su uso masivo en la esterilización industrial como una alternativa a la radioesterilización, siendo además un método de elección en esterilización en hospitales para el procesamiento de ítems sensibles al calor. [1]

El hecho que el óxido de etileno sea un excelente esterilizante gaseoso se debe en gran parte a sus características fisicoquímicas, que se resumen en la Tabla 1.

El EO se disuelve en la matriz de polímeros naturales y sintéticos [3,4] poseyendo además una muy buena compatibilidad con la mayoría de los materiales constitutivos de los productos médicos [1]. Su elevada penetración en polímeros trae como consecuencia negativa la necesidad de eliminar residuales del gas de los productos una vez finalizado el ciclo de esterilización. [1]

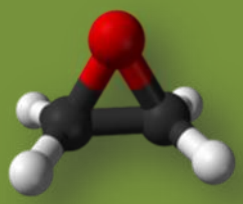
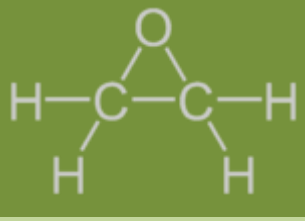
Otro inconveniente para su aplicación radica en las medidas de seguridad operativa a implementar, dado que es inflamable y explosivo en proporción del 3,6-100 % volumen en volumen en aire. [2,3]

Su actividad microbicida radica en la capacidad del anillo inestable y reactivo de la molécula de EO de producir reacciones químicas de alquilación, fundamentalmente sobre bases púricas de ácidos nucleicos DNA y RNA, y sobre grupos amino, sulfhidrilo e hidroxilo de proteínas estructurales y enzimas [1,2,3,4]

La eficacia de la reacción química es influenciada por la concentración del óxido de etileno y por la temperatura, así como por el contenido de humedad de los microorganismos; de la interrelación entre estas tres variables deriva el tiempo de contacto mínimo necesario para lograr el nivel de seguridad en la esterilización. [2,3]

La humedad cumple un rol crucial en la eficacia de la reacción química de alquilación; es sinérgica con el EO para la inactivación de las esporas bacterianas y facilita la penetración del EO en el córtex de las esporas [1]. La humedad relativa óptima requerida para la esterilización por EO ha sido objeto de numerosos estudios, a veces con resultados contradictorios. [1,2,3,5]

***Tabla 1**: Propiedades físicas del óxido de etileno*

	
Propiedades físicas	**EO (óxido de etileno) = C_2H_4O**
Punto de fusión	- 112 ^{0}C
Punto de ebullición	10,4 ^{0}C
Peso molecular	44 g/ mol
Presión de vapor	600 mmHg
Densidad relativa al agua (agua=1)	0,9
Densidad relativa al aire (aire=1)	1,5
Temperatura autoignición	429 ^{0}C
Explosividad (% en aire)	3- 100 %
Solubilidad en agua	Muy elevada

Estudios in vitro a temperatura ambiente demostraron que un tenor de humedad inferior al 20% es ineficaz, considerándose niveles ideales de humedad relativa aquellos comprendidos entre 35 y 45% [5]. Otras investigaciones demostraron que actividad bactericida aumenta cuando se incrementa la humedad relativa, con un máximo de eficacia con tenores superiores al 70% [6]. Normalmente se preselecciona en los ciclos valores entre 50 y 70% de humedad relativa. [3,4]

Una explicación plausible a la necesidad de emplear altos tenores de humedad relativa es que, en las condiciones prácticas de trabajo, la difusión del vapor de agua es lenta, estableciéndose una competencia por el vapor de agua disponible y por el EO gaseoso entre el papel, los plásticos y los microorganismos a ser hidratados [3], condiciones muy distintas a las experiencias in vitro de Phillips y Kaye. [5]

Con respecto a la concentración del gas, es recomendable que la misma no supere los 600 mg/ litro de cámara; ya que está demostrado que trabajar con concentraciones superiores a 450 mg/ litro causa muy poco efecto en el incremento de la capacidad biocida del proceso [4].

En referencia a la temperatura, el gas esteriliza desde los 30 °C–35 °C; por encima de los 45 °C un aumento en la concentración del gas representa poco incremento en la velocidad de la reacción. Las temperaturas óptimas de trabajo oscilan de los 45 °C a 55 °C [2]. En el rango de 30 a 60 °C, la velocidad de muerte disminuye a la mitad por cada 10 °C que disminuye la temperatura. (Q_{10} de 2 a 3). [3]

Equipamiento

El EO, sustancia gaseosa en condiciones normales de presión y temperatura, se utiliza licuado a presión en cápsulas o tanques multidosis; los últimos deben ser lavables y almacenarse en sitios ventilados, al abrigo de la luz. [4,7]

El gas puede utilizarse puro o en mezclas con gases diluyentes, principalmente dióxido de carbono o freones ecológicos, gases que proporcionan un medio diluyente inerte al óxido de etileno.

Actualmente la mayor parte del equipamiento disponible se diseña para trabajar con óxido de etileno puro, para evitar la contaminación del medio ambiente por los disolventes halogenados. Por otra parte, la utilización de CO_2 como diluyente no ha resultado históricamente muy útil por las deficientes propiedades dinámicas de la mezcla; se ha evidenciado variación en la composición del tanque multidosis a medida que el mismo se vacía [4]

Además del esterilizador propiamente dicho, se emplea equipamiento auxiliar constituido por cámaras de preacondicionamiento y cámaras de aireación forzada de los productos esterilizados, así como calderas e intercambiadores de calor [7]

Cámaras de preacondicionamiento:
Las cámaras o habitaciones de preacondicionamiento son recintos con humedad relativa y temperatura controlada. La humedad predeterminada para el proceso se logra por inyección de vapor de agua [7]; la temperatura preseleccionada se logra por inyección forzada de aire precalentado por intercambiadores de calor o por resistencias eléctricas.
El aire inyectado en el recinto o cabina puede recircular hasta en un 100%. Las cámaras deben tener un sistema de registro de datos de humedad relativa porcentual y temperatura a lo largo del tiempo. [7]
Los materiales de construcción de las cámaras deben ser fácilmente lavables, con un diseño que permita con facilidad acceder a la desinfección interna y externa debido al riesgo de acumulación de hongos [7]. Entre los materiales de construcción pueden utilizarse paneles térmicos de poliestireno o poliuretano expandido.

Esterilizadores:
Los esterilizadores por EO puro funcionan realizando todo el proceso a presión subatmosférica [8].
Los esterilizadores con suministro de gas EO mezclado con otros gases inertes operan a presión superior a la atmosférica en la etapa de esterilizado [8]. El EO puro o mezcla se proporciona en tanques multidosis o en cartuchos descartables de aluminio que contienen el EO para una única dosis o ciclo, conforme al volumen de la cámara y a la concentración de EO que se desea lograr [2,8]. En este último caso los cartuchos se colocan dentro del esterilizador en un portacápsula interno, el que se perfora durante el ciclo permitiendo la difusión del gas en la cámara y a través de los productos. [2,8,9,10,11]

Otros servicios o suministros conexionados al esterilizador comprenden:
- Fuerza motriz 220 V/ 380 V
- Vapor de agua para humectación
- Agua destilada
- Agua corriente a 15 ^{0}C para los sistemas de vacío que operan con bomba de anillo líquido
- Aire comprimido
- Nitrógeno criogénico (opcional)
- Sistema de tratamiento de efluentes, tales como un equipo convertidor conexionado al sistema de vacío ("*scrubber*")

El equipamiento esterilizador debe cumplir con las normativas de construcción vigentes en guías internacionales [8,9] y con las recomendaciones establecidas en resoluciones nacionales para los esterilizadores instalados en establecimientos de salud. [11]
Los esterilizadores deben contar con una unidad de control automática, a la que estén conectados los instrumentos de control del proceso, y con un registrador alfanumérico o gráfico de los parámetros del proceso [8,9]. Los requisitos que deben cumplir los instrumentos de control, de registro e indicadores se especifican en detalle en las normativas vigentes para esterilizadores por EO. [8,9]
El material que constituye la superficie interna del esterilizador debe ser resistente a la corrosión; normalmente se utiliza acero inoxidable serie 316 para partes de la cámara y estantes en contacto con la carga; y acero inoxidable de la serie 304 para componentes del equipo sin contacto con el producto. [8,9]
En esterilizadores de pequeño volumen suele utilizarse el aluminio como material de construcción de la cámara, por su elevada capacidad de transmisión del calor.
Para los componentes del equipo previos al ingreso del óxido de etileno a cámara se puede utilizar acero al carbono, aluminio, hierro galvanizado o bronce. Debe evitarse el uso del cobre en cualquier parte del equipamiento que tome contacto con el óxido de etileno, por la capacidad de este metal de catalizar la polimerización del gas esterilizante. [8,9]
Los esterilizadores deben contar con un vaporizador para precalentar el gas antes de su admisión a la cámara del esterilizador [7,9].

Debe realizarse obligadamente tratamiento de efluentes del esterilizador [9,11], existiendo las siguientes alternativas:
- Hidrólisis ácida en tanque convertidor
- Combustión: por acción de la llama, sólo aplicable a EO puro
- Conversión catalítica: sólo aplicable a EO puro, convierte EO en CO_2 y agua

- Recuperación del EO para otros fines industriales
- Eliminación a los 4 vientos

Cámaras de aireación forzada:
Las cámaras de aireación forzada de los productos son recintos con control de temperatura en los que 100 % de aire exterior prefiltrado es obligado o forzado a circular a través de los productos, para ser finalmente eliminado por venteo al exterior a 7 metros por encima del nivel de edificación, sin recirculación del aire [7,11]. La temperatura predeterminada para el proceso se logra precalentando el aire por intercambiadores de calor o por medio de resistencias eléctricas.
Los materiales de construcción deben ser fácilmente lavables, con diseño sin recovecos y sistema de cierre hermético.
Las cámaras deben tener un sistema de registro de datos de temperatura y tiempo [7]

Área de instalación del esterilizador

El área donde se encuentra instalado el esterilizador debe encontrarse en depresión respecto de áreas adyacentes, con renovación de aire mínima de 10 renovaciones por hora. [10]

En las instituciones de salud es mandatoria su instalación en recintos separados de otros equipos, lejos del tránsito del personal. [8,10,11]

Para esterilizadores con volúmenes de cámara útil superiores a 290 litros, son aplicables requisitos de instalación eléctrica antiexplosiva establecidos en normas de referencia norteamericanas o europeas. [12]

Debe contarse con sistemas de captación local del gas, principalmente por encima de la puerta del esterilizador. El área de trabajo con el esterilizador operando debe asegurar una concentración ambiental promedio que no supere el límite ambiental máximo permitido. Es conveniente, y mandatorio para esterilizadores de gran volumen, instalar monitores fijos seteados a un nivel de alarma correspondiente a un 25 % del límite inferior de inflamabilidad del óxido de etileno, correspondiente a 7,5 ppm [12]

A temperatura ambiente el EO polimeriza fácilmente mediante una reacción fuertemente exotérmica. Esta reacción es catalizada por la acción de la luz y del calor, y en presencia de sales y óxidos metálicos (cloruros de hierro, de estaño y de aluminio), ácidos, hidróxidos de metales alcalinos, aminas y compuestos organometálicos. [3]

Proceso

Cargas y empaques:

En el desarrollo del proceso se incluye la especificación de la carga a procesar, las que podrá ser homogénea o mixta. En este último caso para seleccionar los parámetros del proceso y validarlo debe elegirse la peor condición de carga mixta en materiales y densidad ("carga de referencia") [7].

En el caso en que el fabricante elabore una variedad de productos médicos diferentes en composición y configuración, puede contemplarse, de modo de reducir la cantidad de ensayos en la validación de las cargas la generación de "familias de productos", y/o "grupos de procesamiento" [7]

Se deben especificar los empaques primarios a utilizar y la configuración de las cargas a validar y procesar de rutina, así como se deben definir y especificar el empaque secundario. [7]

La confección y la naturaleza constitutiva del empaque primario y secundario debe tener en cuenta la facilidad de remoción del aire y la penetración o difusión del vapor de agua y del gas esterilizante. [1,4]

La permeabilidad al EO del empaque debe ser tal que facilite una desorción rápida del producto que lo ha adsorbido[3].

Los empaques utilizados en el campo hospitalario y en la industria son: [2,4,10,15]
- Papel blanco plano o crepado para uso médico.
- Telas no tejidas, 100% sintéticas polipropileno no tejido tricapa, o con combinación de celulosa y fibras sintéticas.

- Bobinas termosellables con papel plano o de Tyvek^{R} (poliolefinas entrecruzadas) y laminado polietileno – poliéster o polipropileno - poliéster.
- Blísters rígidos PVC, PET, poliamida-polietileno y papel blanco plano o Tyvek ^{R}
- Film de polietileno de baja densidad ≤ 80 µ de espesor.
- Bandejas termoformadas ABS, PVC, PET o HDPE.
- Polietileno film de 40 a 100 micrones de espesor.

Etapas del proceso

Preacondicionamiento:

En esta etapa la carga es sometida a condiciones predeterminadas de temperatura y humedad relativa durante el tiempo mínimo necesario para lograr dentro del producto los rangos de valores de temperatura y humedad especificados para estas variables. Se utiliza para humidificar la carga una humedad relativa igual o superior al 30% [7].
La humidificación se logra por inyección de vapor, y la temperatura por inyección forzada de aire al recinto. [7]
Es necesario establecer el tiempo máximo que debe mediar entre el retiro de la carga de preacondicionamiento y el inicio del ciclo de esterilización, a fin de evitar la pérdida de las condiciones logradas en esta etapa [7]. La etapa de preacondicionamiento puede omitirse, realizando directamente el acondicionamiento en la misma cámara del esterilizador, aunque en estos casos la duración del ciclo de esterilización se prolonga en forma poco operativa. [7]

Ciclo de esterilización:

Finalizado el preacondicionamiento, la carga se traslada al esterilizador y comienza el ciclo.
Se recomienda no exceder un 75 % del volumen útil disponible de la cámara. [2,3,10]

Básicamente las etapas de un ciclo tipo que opera con EO puro son:

a) Inicio de ciclo y Precalentamiento

El sistema de calefacción del esterilizador permite lograr la penetración y homogeinización de la temperatura en la cámara y en los paquetes al valor establecido para el proceso. Esta etapa es uno de los puntos críticos del proceso ya que, si la carga no ha sido sometida a preacondicionamiento previo a su ingreso al esterilizador, puede demandar horas lograr que partes internas de los paquetes alcancen el valor de temperatura estipulada.

b) Remoción del aire

El sistema de vacío del equipo entra en funcionamiento hasta lograr el valor preestablecido de vacío en cámara. Generalmente se utilizan bombas de anillo líquido o sistema Venturi. Cuanto mayor es el nivel de vacío logrado, más se facilita la difusión del vapor de agua y del gas a través de la carga;[1] por otra parte, la reducción del tenor de oxígeno permite que la proporción de EO en la cámara se encuentre por debajo del límite de explosividad [1]. El nivel de vacío y la velocidad para lograrlo están limitados por la naturaleza de los empaques; debe evitarse desgarro o explosión de los sellos de los paquetes, principalmente si se utiliza polietileno en film. [1,2,4]

Una alternativa a efectuar niveles de vacío demasiado profundos consiste en proceder a la inyección de un gas inerte, como el nitrógeno, luego una remoción moderada del aire. [7]

c) Acondicionamiento

El producto que ha sido preacondicionado inicialmente puede perder humedad durante la etapa de vacío inicial del ciclo; por lo tanto se somete nuevamente al producto a inyección de vapor a la temperatura preseleccionada [7]. Una inadecuada humidificación durante el proceso se considera la mayor causa de falla microbiológica. [1,2]
Se puede humectar por inyección de vapor hasta lograr el incremento de presión (Δ Presión) para lograr el tenor de humedad estipulado para esa temperatura, seguido de una etapa corta de estabilización, o más eficientemente por medio de sucesivas inyecciones y evacuaciones de vapor hasta lograr el tenor de humedad especificado [1,2].
En la etapa de acondicionamiento se monitorea y registra temperatura y tiempo; el valor de humedad relativa % se lee y registra en forma directa sólo en algunos esterilizadores con sensores de humedad incorporados; de lo

contrario el cálculo de la humedad relativa se realiza en forma indirecta por fórmula, a partir del dato de incremento de presión en cámara debida a la inyección de vapor de agua [2,7,9].

$$\% RH = 100 \times Pv / Pg$$

donde:

Pv = presión parcial en la mezcla de gases debida al vapor de agua
Pg = presión de saturación del vapor de agua a la temperatura de esterilizado

d) Inyección del gas

Se procede a admitir el ingreso del gas esterilizante a la cámara.
Las normas exigen que el gas ingrese precalentado y filtrado a fin de evitar el ingreso de óxido de etileno líquido y polímeros sólidos a la cámara del esterilizador [2,7,8,9].

e) Exposición al gas o etapa de esterilizado propiamente dicha.

En esta etapa el producto es expuesto al gas con las condiciones de temperatura y humedad relativa deseadas, durante el tiempo mínimo establecido para el proceso.
La homogenización en la distribución del gas se puede lograr por ventiladores eléctricos; los mismos son motores sellados antiexplosivos para no generar chispa eléctrica, realizando así una convección forzada del gas [7]. En muchos casos y en cámaras pequeñas sólo se opera por convección natural, generalmente por circulación forzada de agua caliente en la entrecámara o por calentamiento eléctrico por resistencias.
En el esterilizado los parámetros registrados y monitoreados son temperatura, tiempo y presión en cámara. [7]
La concentración de EO en cámara se calcula indirectamente por el consumo del EO cuando el esterilizador está abastecido por tanques, leyendo la disminución de peso del mismo (control por peso), y por medio de fórmulas utilizando la lectura del Δ Presión en cámara que acompaña la inyección de gas. [7]
En equipos con tecnología más sofisticada la concentración de EO en cámara en puede también medirse en forma directa por medio de cromatografía gaseosa [2], [7]

f) Remoción del gas esterilizante de la cámara - etapa comúnmente llamada "ventilación forzada" o "desgasificación".

Finalizado el tiempo de esterilizado, se elimina el gas de la cámara y de los productos, siendo el procedimiento más común la realización de evacuaciones repetidas del gas, alternadas con inyección de nitrógeno y aire filtrado, o sólo con aire filtrado. Se recomienda repetir el procedimiento 20 veces como mínimo, para eliminar la mayor proporción posible de gas EO de la cámara y de los paquetes. [2]
La bomba de vacío se conecta a un tanque convertidor ("*scrubber*") para el vertido del EO en agua acidulada y lograr su conversión completa a etilenglicol, producto menos tóxico y biodegradable. [2,11]
Otra mecánica consiste en realizar un sistema de barrido con la cámara en ligera depresión, efectuándose una salida al exterior a los cuatro vientos desde el sistema de vacío a 7 metros por encima del nivel de edificación [2,11]

g) Fin de ciclo.

Se realiza la inyección de aire precalentado y prefiltrado por filtros de alta eficiencia [8,9] hasta romper el vacío de la cámara. Por último, se procede a retirar los productos del esterilizador y transferir la carga a las cámaras de aireación forzada.

h) Aireación forzada

Finalizado el ciclo de esterilización se traslada la carga al aireador, donde la misma se somete a circulación forzada de aire a temperatura controlada para eliminar los residuos tóxicos de EO y derivados presentes en el producto, tales como la etilenclorhidrina, (ECH), producto derivado de la reacción del EO con iones cloro presentes en el producto médico o en la cámara del esterilizador.
De no disponer de recintos para la aireación forzada del material, la etapa f) del ciclo de esterilización debe prolongarse hasta que el nivel de residuales en los productos se encuentre por debajo de los límites establecidos.

i) Cuarentena.

El producto permanece en depósito de cuarentena, hasta la realización de los controles finales, que incluyen la lectura de los cultivos de los bioindicadores.

Residuos de óxido de etileno y derivados

Una vez finalizado el ciclo de esterilización, como se indicó en la etapa h) del proceso, pueden quedar retenidos por adsorción cantidades apreciables de EO y de ECH en los productos médicos. El criterio internacional vigente para establecer los límites máximos de EO y ECH en los productos médicos es el de dosis máxima permitida liberada al paciente, de acuerdo a la clasificación previa del producto médico por su criticidad y tiempo de contacto con el paciente: contacto temporario, prolongado o permanente.

Cabe destacar que el etilenglicol, derivado de la reacción entre el EO y la humedad del ambiente o de los productos, ya no se contempla en las normas internacionales como residuo valorable por la baja probabilidad que se encuentren tenores biológicamente significativos en los productos, si el EO se encuentra dentro de los límites máximos permitidos. [1,13]

Se resumen en la Tabla 2 los límites vigentes en la norma ISO 10993, parte 7: 2008, para ambos productos de reacción: EO y ECH:[13]

***Tabla 2**: Límites para EO y ECH en productos médicos, según Norma ISO 10993-7 (2008)*

TIEMPO DE EXPOSICIÓN	GAS	PROMEDIO DIARIO	PRIMERAS 24 HORAS	30 DÍAS	TODA LA VIDA
EXPOSICIÓN LIMITADA	**EO**	**4 mg**	**N/A**	**N/A**	**N/A**
≤ 24 horas	**ECH**	**9 mg**	**N/A**	**N/A**	**N/A**
EXPOSICÓN PROLONGADA	**EO**	**2 mg**	**4 mg**	**60 mg**	**N/A**
> 24 horas y ≤ 30 días	**ECH**	**2 mg**	**9 mg**	**60 mg**	**N/A**
EXPOSICIÓN PERMANENTE	**EO**	**0.1 mg**	**4 mg**	**60 mg**	**2.5 g**
≥ 30 días	**ECH**	**0,4 mg**	**9 mg**	**60 mg**	**10 g**

Para sistemas o *kits* constituidos por varios productos médicos, los límites anteriormente mencionados se aplican para cada producto médico individual, independientemente de los valores hallados en los otros productos.

Además, la norma [13] contempla excepciones o casos especiales para los que los límites anteriores no son aplicables:

- Para lentes intraoculares se permite una dosis de EO por lente y por día de 0,5 µg, o en su defecto 1,25 µg por lente.
- Para oxigenadores y separadores de sangre, la dosis máxima liberada de EO no deberá exceder de 60 mg y 10 mg, respectivamente, ya que se considera que los beneficios derivados de la utilización de estos productos médicos altamente críticos superan los riesgos de una exposición a niveles más altos que los establecidos para otros productos médicos con similares tiempos y frecuencia de contacto con el paciente.
- Siguiendo el mismo criterio, para hemodializadores y para dispositivos para *bypass* cardiopulmonar, los límites permitidos de EO son de 4,6 y 20 mg, respectivamente.
- Un criterio especial [13] se aplica a dispositivos e implantes con contacto superficial con el paciente, llamado TCL (límite tolerable de contacto), enfocado en establecer la máxima cesión de EO permitida al paciente por

unidad de superficie del producto médico; por ejemplo, para campos quirúrgicos, el límite propuesto es de 10 µg/ cm^2. Siguiendo idéntico criterio, para ECH se establece en 5 µg/ cm^2. Tanto en el caso del EO como en el de la ECH, si se suscitara la más mínima irritación incluso con una concentración por unidad de superficie menor a la especificada, la aparición de esta irritación dará lugar a la aplicación del criterio de límites máximos permitidos, siguiendo el criterio de dosis liberada al paciente.

Validación del proceso

Validar es obtener y documentar evidencias que prueben en forma fehaciente que un equipo y/o proceso cumple en forma repetitiva con criterios de aceptación predeterminados. En la validación de un proceso de esterilización por EO distinguimos las siguientes etapas en forma secuencial:

- Aptitud del equipo:
  - Calificación de la Instalación (I.Q.)
  - Calificación Operativa (O.Q.)
- Calificación de Desempeño (P.Q.):
  - Microbiológica
  - Física
- Confección del Informe Final de Validación

En los casos en que el proceso a calificar pueda efectuarse en más de un esterilizador, se implementa el criterio de "equivalencia de procesos" [7] a fin de minimizar la cantidad de estudios requeridos durante la validación. Los esterilizadores no necesariamente deben ser idénticos, ni tampoco estar configurados necesariamente con idénticos parámetros. En estos casos, el proceso completo debe validarse en una de las cámaras; mientras que el esterilizador adicional podría requerir una calificación de desempeño reducida, previa realización de las calificaciones de instalación y operativas satisfactorias.

Aptitud del equipo:

Calificación de la Instalación (I.Q.)

Es la verificación documentada de que todos los aspectos de la instalación del equipo y los suministros de planta son los correctos. Se deben cumplir las especificaciones del fabricante. Estos aspectos son:

- Características del equipo y sus componentes: Se verifica visualmente para los componentes la correspondencia de: tipo, modelo, nro. de serie, fabricante, en listado tipo "*checklist*".
- Software: El software instalado en el equipo al igual que sus funciones y parámetros iniciales debe ser el especificado por el fabricante y debe validarse.
- Verificación de los suministros: Para cada uno de los suministros debe verificarse: tensión, capacidad instalada, presión de línea, caudal, calidad, válvula, conexión disponible, etc.
- Verificación de la protección contra explosividad e inflamabilidad de acuerdo con NFPA 560 [12], aplicable para esterilizadores de gran tamaño.
- Planos y Manuales de servicio y de operación: Los planos de instalación, de cañerías y de circuitos eléctricos deben estar actualizados, disponer de título, código, revisión y fecha de validez. Los planos deben ser contrastados con el equipo y los servicios. Se debe verificar la existencia de manuales de servicio técnico y de operación, y desarrollar procedimientos escritos para la operación y el mantenimiento del equipo.
- Calibración de instrumentos: Deben estar calibrados frente a instrumentos patrón todos los instrumentos de control, de registro, de referencia visual y de seguridad operativa del esterilizador y de todo el equipamiento accesorio.

Calificación operativa (O.Q.)

Es la verificación documentada de que el equipo funciona dentro de los límites o rangos predeterminados cuando se lo opera sin carga, bajo instrucciones de uso.

Para efectuar los ensayos físicos de calificación operativa del esterilizador y para la posterior calificación física de las cargas, se emplea instrumental de validación. Éste consiste en termocuplas y sensores de presión conectados a adquisidores electrónicos de datos ("validadores") y/o equipos portátiles tipo *data logger* de temperatura, humedad relativa y/o presión. Todos los instrumentos de validación deben estar calibrados, y tener mayor exactitud que los instrumentos propios del esterilizador.

La cantidad de ensayos y repeticiones y la cantidad de sensores en cada tipo de ensayo a realizar en la calificación operativa se detallan en la normativa de referencia. [7]

En el preacondicionamiento se realizan ensayos de distribución de temperatura y humedad relativa en la cámara, y medición de las renovaciones horarias de aire. [7]

En el esterilizador se realiza una prueba de hermeticidad [7,8,9], y ensayos repetitivos de distribución de temperatura. En éstos últimos ensayos el criterio de aceptación es obtener una temperatura en esterilizado en todos los puntos $\leq \pm 3\ ^0C$ del *set point*. [7]

Además, se deberán caracterizar y definir en el OQ: [7]

- la profundidad del vacío inicial y el tiempo para lograrlo
- el incremento de la presión por entrada de nitrógeno
- el número de repeticiones o pulsos inertización
- el incremento de la presión por ingreso del vapor para humectación (*ΔPresión y cálculo de RH%)*
- el incremento de la presión por ingreso del gas y gasto de gas en kg *(ΔPresión, ΔPeso y cálculo de concentración de EO)*
- la profundidad del vacío y tiempo para lograrlo en desgasificación
- el incremento de la presión por entrada de aire filtrado o nitrógeno
- el número de repeticiones o pulsos inertización y vacío - aireación

En las cámaras de aireación forzada se determina el perfil de temperaturas, caudales de aire y patrones de flujo de aire. [7]

Calificación de desempeño (P.Q.)

Es la verificación documentada de que el equipo, calificado previamente como apto, cuando se lo opera con carga de producto, permite obtener en forma reproducible un producto seguro y eficaz. En la calificación de desempeño se procede a realizar los ensayos con la cámara cargada con cada patrón de carga a validar, o en su defecto para cada familia de productos. [7]

Calificación microbiológica

Tiene por objeto determinar el tiempo de esterilizado que asegure en todos los puntos de la carga una letalidad suficiente para lograr un SAL de 10^{-6}.

Se utilizan bioindicadores en posiciones de difícil acceso al gas, previa estimación de la carga biológica habitual del producto, o "*bioburden*", y corroborando que ésta sea menor en resistencia y en población al bioindicador utilizado [7]. El bioindicador de referencia para EO es *Bacillus atrophaeus* [14]. El bioindicador se coloca dentro de la carga bajo su presentación comercial, o inoculando suspensiones del microorganismo dentro del producto, en los casos en que la colocación de bioindicadores dentro de la carga en lugares de difícil acceso no fuera practicable. [7]

Existen dos métodos principales para llevar cabo la calificación microbiológica [7]:

Método A:

Este método combina el conocimiento de la resistencia (valor "D") del bioindicador con el conocimiento de la población y resistencia del bioburden del producto médico a esterilizar. Para aplicar en forma válida este método es mandatorio que el bioburden del producto sea consistente y reproducible entre los lotes

sucesivos del producto médico a esterilizar, así como que su resistencia a los parámetros del proceso de esterilización sea menor o igual que la del bioindicador.

Cumplidas estas condiciones, el método consiste en determinar la velocidad de inactivación del indicador biológico (valor "D" en las condiciones experimentales) realizando sucesivas corridas con tiempos de exposición al gas, o tiempos de esterilizado fraccionados y crecientes.

El enfoque más comúnmente utilizado en el Método A es el método de la fracción negativa, desarrollado por Holcomb-SpearmanKarber [15]. En este método un número predeterminado de indicadores biológicos localizados dentro de la carga se someten a varios ensayos con exposición gradual creciente en el tiempo de esterilizado, manteniendo todas las demás variables del ciclo constantes. Después de cada una de las sucesivas exposiciones de tiempo de esterilizado creciente, se procede a cultivar los bioindicadores, evaluando la proporción de los mismos que no desarrolla luego de la incubación (fracción negativa)

Obtenida la fracción negativa en cada una de las corridas, por utilización de fórmulas se calcula el valor D (coeficiente de reducción decimal) para el bioindicador en las condiciones experimentales. Conocido el D se extrapola el tiempo de exposición al gas para lograr la reducción de 12 logaritmos de población del bioindicador [15]. Este tiempo definirá entonces el tiempo de esterilizado para el ciclo.

Método B:

Método conservador del *overkill* o sobremuerte, el enfoque más utilizado por resultar el más práctico y más sencillo de interpretar es la aproximación del medio ciclo.

Se colocan los bioindicadores dentro de la carga, en un número acorde al volumen de la carga; el mismo se indica en la norma de referencia para la validación del proceso [7]. Se somete la carga al proceso realizando tres ensayos consecutivos con idéntico tiempo de exposición al gas. Debe demostrarse en todos los casos la inactivación de todos los bioindicadores.

Es mandatorio un cuarto ensayo adicional con menor tiempo de exposición al gas que demuestre la recuperación de sobrevivientes.

Cumplido el criterio de aceptación, el tiempo de esterilizado para el ciclo se define como el doble de tiempo que el utilizado en los medios ciclos.

Calificación física

Los sensores de temperatura y humedad se colocan dentro de la carga, perforando los empaques.

La cantidad de repeticiones de cada ensayo debe ser de un mínimo de tres para demostrar reproducibilidad. La cantidad de sensores en cada ensayo de acuerdo al volumen de la carga se detalla en la norma de referencia. [7]

En el preacondicionamiento se evalúa el perfil de temperatura y humedad dentro de la carga durante un período de tiempo mínimo hasta que la carga alcance los valores mínimos predeterminados para estas dos variables. [7]

Se efectúa un ensayo adicional de medición de las mismas variables durante la transferencia de la carga al esterilizador, a fin de establecer en la validación el tiempo máximo permitido para esta transferencia. [7]

En el ciclo de esterilización se realizan ensayos de penetración de temperatura y humedad en la carga en la etapa de acondicionamiento, y de penetración de temperatura en la etapa de esterilizado [7].

Es lícito efectuar ensayos de calificación física en forma simultánea con la calificación microbiológica [7]. En estos casos, los tres ensayos consecutivos se realizan con los tiempos desafío de la calificación microbiológica, por lo que obligadamente se debe complementar con un ensayo adicional utilizando tiempos más largos de exposición.

Se redefinen y caracterizan los cambios de presión a lo largo del ciclo de esterilizado debidos a la remoción del aire, ingreso de vapor, ingreso de gas EO y pulsos de ventilación, ahora con carga de producto. Se calcula el gasto en kg de gas operando el equipo con el producto. En la aireación forzada, se evalúa el perfil de temperatura dentro de la carga durante un período de tiempo mínimo hasta estabilización de lecturas, [7] y el

tiempo mínimo de residencia de la carga hasta que los productos se encuentren dentro de los valores máximos regulados para EO y su producto de reacción, etilenclorhidina (ECH).

Validación de residuales

Para efectuar la validación de los residuales, la que se incluye dentro de la calificación de desempeño, se deben realizar ensayos de determinación de niveles de EO en el producto esterilizado con tiempos crecientes de aireación forzada. Se recomienda confeccionar una curva de desorción con los valores obtenidos [13].

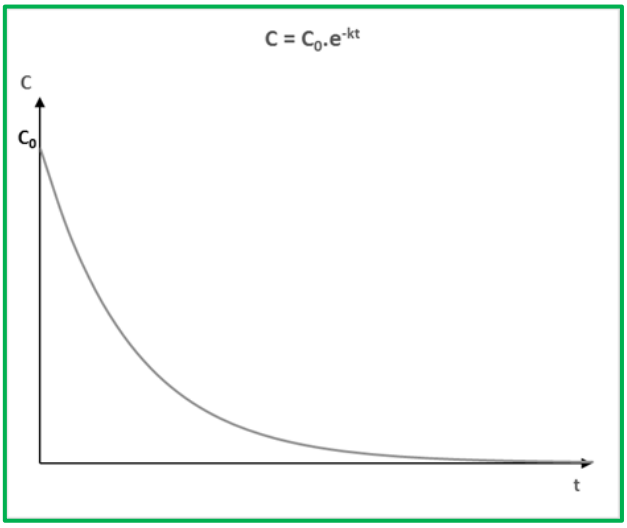


Figura 1

Para la mayor parte de los materiales constitutivos de los productos médicos, la disipación del óxido de etileno a medida que trascurre el tiempo de aireación sigue una cinética de primer orden, como se muestra en la Figura 1.

Siendo la ECH un residuo permanente, no disipable por aireación, no es aplicable la realización de una curva de deserción.

Representando el logaritmo natural de la concentración de EO en función del tiempo de aireación, o tiempo transcurrido tras la finalización del ciclo de esterilización en las condiciones propuestas por el fabricante, se obtiene un gráfico como el de la Figura 2. De este modo se rectifica la gráfica anterior y se obtiene una relación lineal entre el logaritmo neperiano de la concentración de EO con el tiempo de desorción.

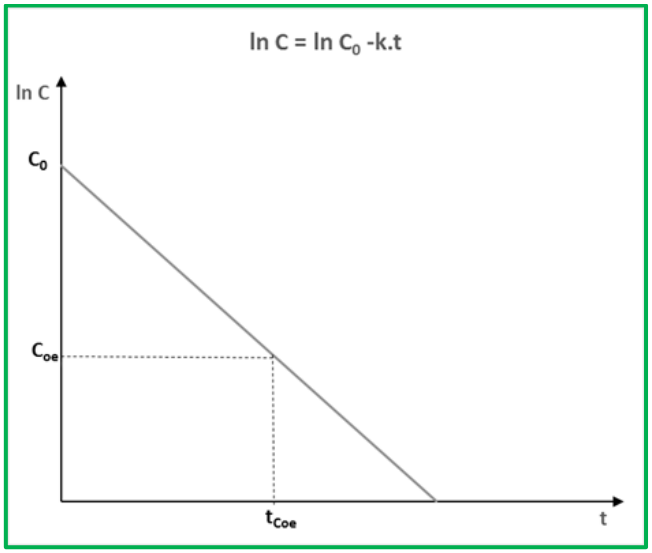


Figura 2

En la ecuación de la recta:

$$\ln C = \ln Co - kt,$$

***k**: es la pendiente negativa de la recta, representa la constante de desorción de EO para ese producto médico*

***ln Co**: es la ordenada al origen de la recta, representa el logaritmo natural de la concentración de EO, obtenida a tiempo 0 de desorción del gas*

***t**: es el tiempo de desorción del producto médico en las condiciones experimentales a validar*

***C_{oe}**: es la concentración de EO equivalente a la dosis promedio diaria permitida para el producto médico, dosis indicada en la Tabla 2 según sea el producto de contacto breve, permanente o prolongado*

***t_{Coe}**: es el tiempo de desorción a determinar por interpolación en la gráfica, para el que se han alcanzado las concentraciones máximas permitidas equivalentes a las dosis promedio diarias (C_{oe})*

Para confeccionar la curva de desorción, se deben realizar al menos cinco determinaciones analíticas consecutivas obtenidas a partir de cinco muestras del mismo lote de esterilización, muestras que han sido sometidas a tiempos crecientes de aireación.

El primer valor o tiempo 0 (punto inicial de la curva de desorción) corresponderá al valor de residuo de EO obtenido al finalizar el ciclo de esterilización, mientras que los valores restantes representarán concentraciones de EO en el producto médico a tiempos crecientes de aireación.

Los datos crudos obtenidos en las determinaciones analíticas [13] se obtienen y expresan como concentración de EO (normalmente µg/ g de producto médico), y no en dosis o cantidad absoluta, siendo valores de concentración los graficados en la curva de desorción.

Para conocer la C_{oe} expresada en µg/g de producto médico, equivalente a la dosis promedio diaria permitida por normas [13], se aplican los siguientes cálculos:

Para contacto permanente:

$$C_{oe}\left({}^{\mu g}/_{g}\right) = \frac{0.1\ {}^{mg}/_{día} \times 1000\ {}^{\mu g}/_{mg} \times 2500\ días}{masa\ del\ producto\ médico\ (g)}$$

Para contacto prolongado:

$$C_{oe}\left({}^{\mu g}/_{g}\right) = \frac{2\ {}^{mg}/_{día} \times 1000\ {}^{\mu g}/_{mg} \times 30\ días}{masa\ del\ producto\ médico\ (g)}$$

Para contacto limitado:

$$C_{oe}\left({}^{\mu g}/_{g}\right) = \frac{4\ {}^{mg}/_{día} \times 1000\ {}^{\mu g}/_{mg} \times 1\ día}{masa\ del\ producto\ médico\ (g)}$$

Una vez construida la curva en condiciones experimentales y calculada la C_{oe} de acuerdo al tiempo de contacto del producto médico a validar, se podrá calcular el tiempo mínimo de desorción (t_{Coe}), para obtener residuales dentro del límite permitido según el tiempo de contacto del producto médico. Para ello se aplica la siguiente fórmula:[1,16]

$$tiempo\ de\ desorción\ (días) = \frac{\ln C_o - \ln C_{oe}}{k}$$

Como guía para el fabricante para determinar la porción del producto médico representativo de la peor condición de retención del EO, realizar la toma de muestras y el transporte hasta el laboratorio analítico, así como para obtener el cálculo del tiempo de venteo del producto médico esterilizado, se puede consultar la página oficial del INTI, Departamento de contaminantes orgánicos: https://www.inti.gob.ar/ambiente/contaminantesorganicos.htm (16)

Informe final de validación:

El informe debe reunir o recopilar toda la documentación obtenida en la validación, en forma ordenada y secuencial(7). Debe incluir:

- Especificaciones del equipamiento.
- Registros de calibración de instrumentos.
- Registros físicos de todos los ensayos del OQ.
- Detalle de los productos, envases, diagrama de cargas.
- Resultados de las pruebas biológicas del PQ.
- Registros físicos de todos los ensayos del PQ.
- Estudios de residuales en los productos.
- Hoja de especificaciones para el proceso, con el valor y rango permitido para cada variable física del proceso.
- Registros de firmas responsables.

Recalificación (7):

Consiste en la repetición de una parte o de la totalidad de la validación original, a fin de confirmar que se mantiene la aceptabilidad del proceso. En forma periódica y con periodicidad mínima anual, se debe efectuar una revisión global de las prestaciones del proceso completo (preacondicionamiento, esterilización y aireación) así como de los cambios técnicos producidos en el período para asegurar que se ha mantenido la validez de la validación vigente del proceso.

También se debería incluir una revisión del funcionamiento de la cámara del esterilizador y de cualquier cambio crítico del equipamiento suscitado durante el período para asegurar que los resultados de la Calificación de la instalación y de la Calificación Operativa siguen siendo válidos.

Además, se debe examinar cualquier tendencia adversa en el funcionamiento normal del equipamiento y eventuales fallos de esterilidad registrada en el período, aunque el proceso aparentemente siga dentro de sus especificaciones.

Basado en los resultados de esta revisión completa, se determina el alcance de la recalificación física y microbiológica requerida, proponiéndose tres posibilidades (7)

1) Recalificación total: consiste en la repetición completa de la calificación de desempeño física y microbiológica. Esto puede ser necesario, por ejemplo, después de un cambio de diseño en la carga o en la configuración producto/ embalaje, o tras un cambio crítico en el esterilizador o en sus suministros.
2) No requerirse recalificación ni física ni microbiológica: esto es aplicable cuando no se efectuó ningún cambio ni en el producto ni en el diseño de la carga ni embalaje; ni sobre el esterilizador ni sobre sus servicios, y además se verificó que el proceso de esterilización ha funcionado de manera fiable durante el período analizado.
3) Recalificación microbiológica reducida: puede ser necesaria para proporcionar la evidencia que no ha existido ningún cambio no detectado desde la última calificación o recalificación microbiológica. Normalmente incluye como mínimo una exposición o ciclo fraccional conjuntamente con mediciones físicas de temperatura y humedad de la carga.

En todos los casos anteriores, las decisiones tomadas deben estar documentadas y justificadas por profesionales competentes. (7)

Es recomendable comparar los registros de la recalificación con los de la validación original, manteniendo el mismo formato. [7]

Monitoreo y control de ciclos de rutina

Monitoreo de parámetros físicos:

Todos los parámetros controlados deben encontrarse dentro de las especificaciones de valor prefijado y rango permitido estipuladas en la validación del proceso. Los parámetros físicos a monitorear y registrar en cada proceso y cada lote de producto esterilizado son: [7]

Durante la etapa de Preacondicionamiento: tiempo de residencia de la carga en esta etapa, temperatura y humedad relativa porcentual, medidos en la cámara; tiempo transcurrido entre el retiro de la carga de preacondicionamiento y el comienzo del ciclo en el esterilizador. [7]

Durante el Ciclo de Esterilización:

- tiempo y temperatura en el acondicionamiento [7],
- nivel de vacío inicial y tiempo para lograrlo [7],
- Δ presión y número de pulsos inertización con nitrógeno
- Δ presión por entrada de vapor en acondicionamiento (cálculo de RH%), o medición directa de la RH% obtenida por lectura directa de sensores [2,7,8]
- Δ presión por entrada de gas (cálculo de cc de EO) [2,7,8]
- Δ peso del cilindro contenedor (cálculo de cc de EO) [2,7,8]
- Tiempo, temperatura y presión en la etapa de esterilización medidos en cámara [7]
- Δ presión y tiempo en los pulsos de vacío – ingreso de gas inerte y/o aire y número de pulsos en la etapa de evacuación del gas.[7]

Durante la Aireación forzada: tiempo de residencia de la carga, temperatura medida en cámara, y cambios de presión registrados (si los hubiera, de acuerdo a la tecnología utiliza) [7]

Monitoreo químico:

Se utiliza un control químico externo (clase I Norma ISO 11.140), bajo la forma de cintas o etiquetas autoadhesivas [18] en cada empaque primario en la esterilización hospitalaria; y al menos un indicador externo en cada empaque secundario en la esterilización industrial de productos médicos.

La utilización de controles multiparámetro e integradores (clases IV y V de la citada norma) [18] queda a criterio del fabricante, debido a su localización interna en el paquete. Se debe verificar un cambio neto al punto final especificado por el fabricante finalizado el ciclo de esterilización, en todos los indicadores químicos. [7]

Monitoreo biológico:

Para el monitoreo de los procesos de esterilización por óxido de etileno se emplean de rutina esporas de *Bacillus atrophaeus* [14]. Los bioindicadores para el monitoreo de rutina se colocan en productos simulados entre la carga, en posiciones comprometidas para la difusión del gas, antes de que el producto ingrese a la etapa de preacondicionamiento [7]. El monitoreo biológico es obligatorio en todos los ciclos, salvo que las condiciones de la validación del proceso se hayan efectuado para permitir una liberación paramétrica de la carga [7,11,17]

Finalizado el ciclo de esterilización los bioindicadores se retiran de la carga y se cultivan, interpretándose los resultados como obtención de desarrollo (resultado positivo) o ausencia de desarrollo (resultado negativo). [7]

Liberación de la carga

Liberación convencional [7]

- Cumplimiento de todas las especificaciones de los parámetros físicos
- Inactivación de todos los IB

- Cambio al punto final de los indicadores químicos

Liberación paramétrica [7] *(sólo para configuraciones de carga homogéneas)*

Es la declaración de idoneidad del proceso de esterilización del producto, efectuada sobre la base de la medición y evaluación de parámetros físicos, sin tener en cuenta resultados de test utilizando bioindicadores.

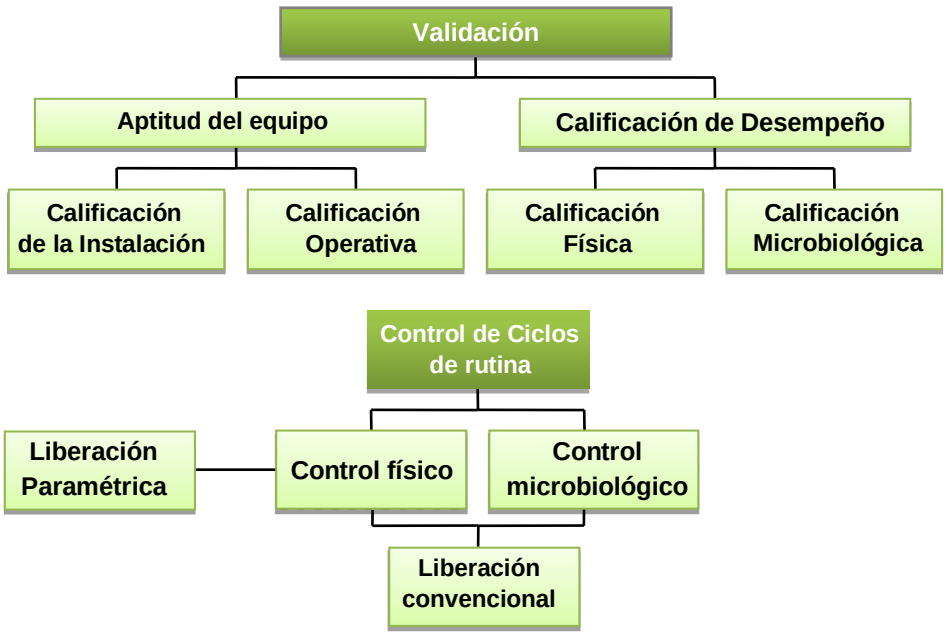
Para efectuar la liberación paramétrica se deben cumplir todas las especificaciones para los parámetros físicos establecidos antes en "Validación del proceso" [7], y adicionalmente a los requisitos para liberación convencional deben incluirse los resultados de mediciones de:

- temperatura de la **carga** en preacondicionamiento y en esterilizado
- humedad en la **cámara** en acondicionamiento medida en forma directa
- concentración de gas en **cámara** medida en forma directa
- temperatura de la **cámara** medida en **dos** posiciones diferentes
- temperatura de la **carga** y medición de renovaciones horarias en aireación

Síntesis de Validación y Monitoreo de ciclos

Los pasos de la Validación de un proceso de esterilización por EO y su correspondiente monitorización de ciclos de rutina se reseñan en la Figura 3.

Figura 3*: Validación del proceso y control de ciclos de rutina*



Aplicación en la industria de productos médicos. Incompatibilidades y limitaciones del método

Algunas de las aplicaciones del EO en la esterilización de productos para el cuidado de la salud incluyen: máquinas de riñón artificial, catéteres cardíacos, generadores de marcapaso y cardiodesfibriladores, máquinas corazón-pulmón, filtros de diálisis, laseroscopios, placas de petri descartables, hojas de dermátomos y escalpelos, suturas absorbibles y no absorbibles, DIU, espéculos ginecológicos, jeringas y agujas hipodérmicas, tubos de traqueostomía, tubos endotraqueales, ureteroscopios, bandejas para traqueostomía, bolsas de orina y packs de ropa quirúrgica descartable[1].

Cabe destacar que el EO es el agente esterilizante indicado para la esterilización de dispositivos electrónicos, y productos en base a acetatos y Teflon^{R} [1]. También se utiliza en la esterilización de prótesis endovasculares con cubierta de sustancias químicas activas que son afectadas por la radiación [1].

En referencia a los materiales constitutivos compatibles con el método podemos mencionar: [1]

Acetales (Delrins[R])
Acrílicos
Acero inoxidable
Acrílico
Aluminio
Caucho de silicona
Cloruro de polivinilo (PVC [R])
Elastómeros termoplásticos o estirenos
Gomas naturales
Poliamidas (Nylons alifáticos y aromáticos, 12, 11, 6/12 y 6/12)
Policarbonato
Poliésteres
Poliestireno y sus copolímeros
Polieteretercetona (PEEK[R])
Polietileno de baja, mediana y alta densidad
Polipropileno y sus copolímeros
Polisulfona
Poliuretano
Teflón

Otros usos:

- El EO es utilizado además en la descontaminación de especias, cacao y frutos desecados, y como fumigante de libros, cuero, papel y muebles [1,3,19]
- En la industria farmacéutica se lo utiliza para esterilizar materias primas en polvo cuya irradiación altera las estructuras activas, tales como estreptomicina, gentamicina y corticoides. [3,4]

Limitaciones técnicas del método:

- Se detecta un alto tenor de residuales de EO luego de la esterilización de PVC y gomas naturales [4,10], y tenores relativamente altos en polipropileno y papel [4], requiriéndose en estos casos períodos de aireación forzada o cuarentena posterior a ésta, prolongados.
- Se deben respetar los tiempos de aireación forzada o cuarentena antes de proceder a la liberación del material [1], en base a la evaluación de residuales obtenidos durante la validación del proceso [7,13].
- Sólo los ítems metálicos y de vidrio pueden ser utilizados con la aireación mínima mandatoria del fabricante [2].
- Se ha documentado cracking de algunos plásticos con la utilización de óxido de etileno en mezclas con freones (policarbonato, acrílicos) [1]
- El proceso completo insume tiempo; pese a ser muy eficaz, no es eficiente, máxime para su empleo en instituciones de salud que requieran rápida rotación de sus bienes [1].

Controversias y conclusiones

Las principales desventajas del EO como método de esterilización derivan de algunas características inherentes a la sustancia: su inflamabilidad y explosividad, su carcinogenicidad y potenciales daños reproductivos al personal expuesto [1,2,17,20], así como el alto costo del equipamiento y de los sistemas de control.

El óxido de etileno fue reclasificado por la IARC en 1994 de potencial cancerígeno, a cancerígeno declarado en humanos.[20]

La mayoría de las desventajas derivadas de su utilización quedan solventadas por los sistemas de control en el equipamiento utilizado, los sistemas de eliminación de efluentes, el entrenamiento y uso de elementos de

seguridad operativa para el personal, las instalaciones antiexplosivas para equipos industriales, [12] el monitoreo ambiental de los niveles de EO en el área de trabajo, y los pertinentes controles de salud sobre el personal expuesto. [1,17]

En la esterilización industrial a gran escala su empleo como agente esterilizante proporciona mayores ventajas que los riesgos inherentes a su utilización. [1]

Su aplicación en centrales de esterilización debe estar limitada a la reesterilización de productos sensibles al calor y a la humedad [3,4] y restringida a un mínimo, reduciendo a un nivel seguro la exposición del personal y de los pacientes [3] por medio de buenas prácticas [10,15] y el adecuado diseño del área [1,17]

Bibliografía:

1. Rogers, Wayne: "*Sterilization of Polimer Healthcare products*".Rapra Technology Limited, p.205, 2005, U.K.
2. Carbone, N. y Agostini, Helga Sager: "*Nociones básicas sobre la esterilización por Óxido de etileno*", FUDESA, Julio2012.
3. Christensen, E.A. and Kristensen, H. in: Russell, A.D.; Hugo, W.B.; Ayliffe, G.A.J.: "*Principles and Practice of Desinfection, Preservation and Sterilization*, 5 thedition. Chapter 15.3: *Gaseous Sterilization*", p. 307. Blackwell Scientific Publications; Oxford, 2013.
4. Gardner, J.F. and Peel, M.M.: "*Introduction to Sterilization and Disinfection: Sterilization by gaseous chemicals*". Edimburgh, Churchill Livingstone, 1991.
5. Phillips, J.J. and Kaye, S.: "*The sterilizing action of gaseous ethylene oxide*". Review.American Journal of Hygiene, Vol. 50, p. 270-279, 1949.
6. Ernst RR, Shull JJ. "*Ethylene oxide gaseous sterilization*. *Influence of method of humidification*". Applied Microbiology, vol. 10:p. 337-341, 1962.
7. EN ISO 11135: 2014: "*Esterilización de productos sanitarios con óxido de etileno*: *Requisitos para el desarrollo, la validación y el control de rutina de un proceso de esterilización para productos sanitarios*", 2014.
8. Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) Standard 24:1999 R 2013: "*American National Standard for Automatic, General purpose ethylene oxide sterilizers and Ethylene oxide sterilant sources intended for use in health care facilities*". Arlington, VA: AAMI, 1999.
9. EN 1422: 2014: "Ste*rilizers for medical purposes- Ethylene oxide sterilizers- Requirements and test methods"*. AENOR, 2014
10. Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) Standard 41:2008 / ®: 2012: "*Ethylene oxide sterilization in health care facilities. Safety and Efectiveness*". Arlington, VA: AAMI, 2008.
11. Resolución 102:2008: "*Directrices de organización y funcionamiento de Centrales de Esterilización y procesamiento de productos médicos en establecimientos de salud públicos y privados*", p.12-13. Ministerio de Salud, 2008.
12. NFPA 560- "*Standard for the Storage, Handling and Use of Ethylene Oxide for Sterilization and Fumigation*". National Fire Protection Association, Quincy, M.A., 2007.
13. ISO 10993-7: 2008: "*Biological evaluation of medical devices- Ethylene oxide sterilization residuals*". Second edition, Oct. 2008
14. ISO 11138-2: 2017: "*Sterilization of Health Care products. Biological Indicators. Parte 2: B.I. for Ethylene oxide sterilization processes*", 2nd.Ed, 2017.
15. Holcomb, R.G and Pflug, I.J: «*Método SpearmanKarber para la determinación de análisis cuantal de destrucción microbiana*"; Environmental Sterilization laboratory, Minneapolis, 5th Ed.1988, pag 83-100, USA.
16. https://www.inti.gob.ar/ambiente/contaminantesorganicos.htm
17. Resolución 1547:2007: "*Guía de procedimientos y Métodos de Esterilización y Desinfección para Establecimientos de salud públicos y privados*", p.20-22. Ministerio de Salud, 2007.
18. ISO 11140-1: 2014: "*Sterilization of Health Care products. Chemical indicators*. Parte 1: *General*"; 2nd Ed, 2014.
19. Fowles, Jefferson: "*Ethylene oxide in a food supplies: an assesments of health risks Reviews in Food and Nutrition toxicity*", Ed. By Watson and Preedy, p. 350-353; 2004
20. International Agency for Research on Cancer (IARC): *Summaries and Evaluations. Ethyleneoxide (Group I)*. Vol. 60 p. 73, 1994.

Capítulo II.2.D

Filtración esterilizante de fluidos

Mino Covo

Introducción

Filtros de profundidad y filtros de superficie

Mecanismos de la filtración esterilizante. Mitos y verdades sobre las membranas esterilizantes

Ensayos de eficiencia bacteriológica

Ensayos de los cartuchos de membrana y la carga de bacterias

Bibliografía

Introducción

A comienzos del siglo XX cuando las primeras soluciones parenterales se comienzan a producir en escala industrial, llega la necesidad de un método para esterilizar productos sensibles al calor que no se puedan someter al proceso en autoclave. Comienza entonces la filtración industrial.

En los primeros intentos se utilizaron cilindros de porcelana porosa (Chamberlain 1884, método ensayado por Luis Pasteur), pero dificultades en su limpieza, el peligro de la contaminación cruzada y su fragilidad llevaron a su reemplazo. A continuación, en 1915 Schmitthenner utilizó placas de amianto y celulosa anticipando el uso de los filtros prensa. Zsigmondy entre 1914 y 1918, comenzó con ensayos de membranas que tuvieron desarrollo a partir de 1929 en Gottingen, Alemania, patentando su método que desarrolló asociado con Sartorius-Werke con su producción a escala industrial.

El uso de las placas de amianto, celulosa en filtros prensa siguió en aplicación hasta 1975, año en que se las prohibió, tanto en bebidas como en soluciones inyectables, al eliminarse el uso del amianto por ser considerado cancerígeno. Cabe destacar que las placas de amianto tienen la ventaja de ser prácticamente esterilizantes por ser constituidas por fibras muy finas con alta carga electrostática positiva. Siendo filtros puramente de profundidad, retienen en su interior partículas de carga negativa tales como los microorganismos y los piretógenos con altísima eficiencia.

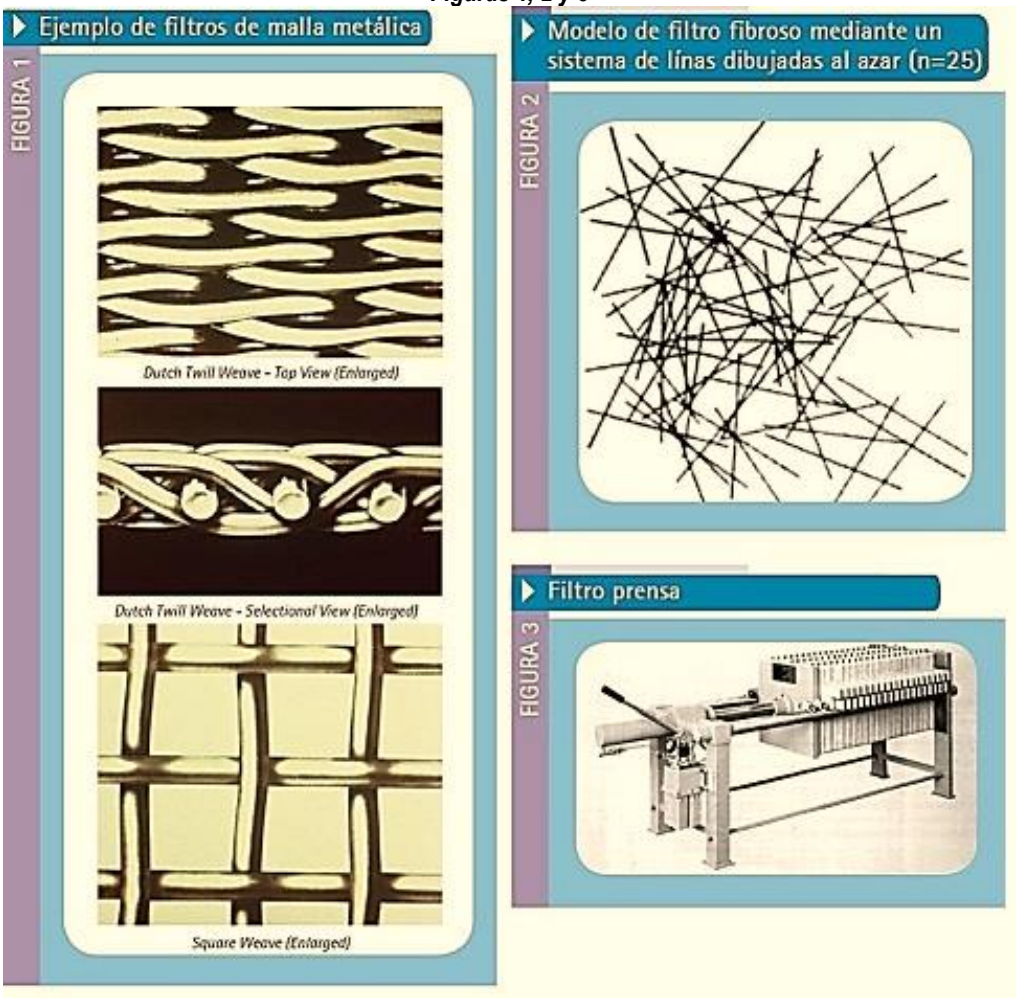
Si bien las placas eran insustituibles antes que se produjeran los cartuchos de membrana, presentaban algunas desventajas tales como la poca resistencia a las presiones diferenciales elevadas y la imposibilidad de someterlas a un ensayo de integridad. Fueron fabricadas y comercializadas por Seitz-Werke, siendo el modelo Seitz Eks Filter, símbolo de placa esterilizante.

Filtros de profundidad y filtros de superficie

Veremos a continuación las diferencias fundamentales entre los filtros puramente de profundidad con los filtros llamados de superficie, aunque notaremos que hasta las membranas de grado esterilizante tiene efectos filtrantes en su espesor. Podríamos decir entonces que el único ejemplo de filtro de superficie es el tamiz, pues su espesor es despreciable comparado con la separación entre mallas. Llamaremos entonces filtros de profundidad a los filtros donde la retención de partículas se hace mayormente en su interior.

Durante muchos años se clasificaron las membranas como filtros de superficie. El uso del nombre de “superficie” para las mismas puede llevar a confusiones pues, aunque gran parte de la filtración se realiza en su superficie, hay también retención de contaminantes en su interior, sea por estrechamiento del tamaño del poro o por fenómenos de atracción superficial. Queda entonces como ejemplo de filtro de superficie la malla metálica ilustrada en la Figura 1, pues las partículas quedan retenidas en su superficie por efecto tamiz no habiendo espesor como para retener las de menor tamaño por otros efectos.

Figuras 1, 2 y 3

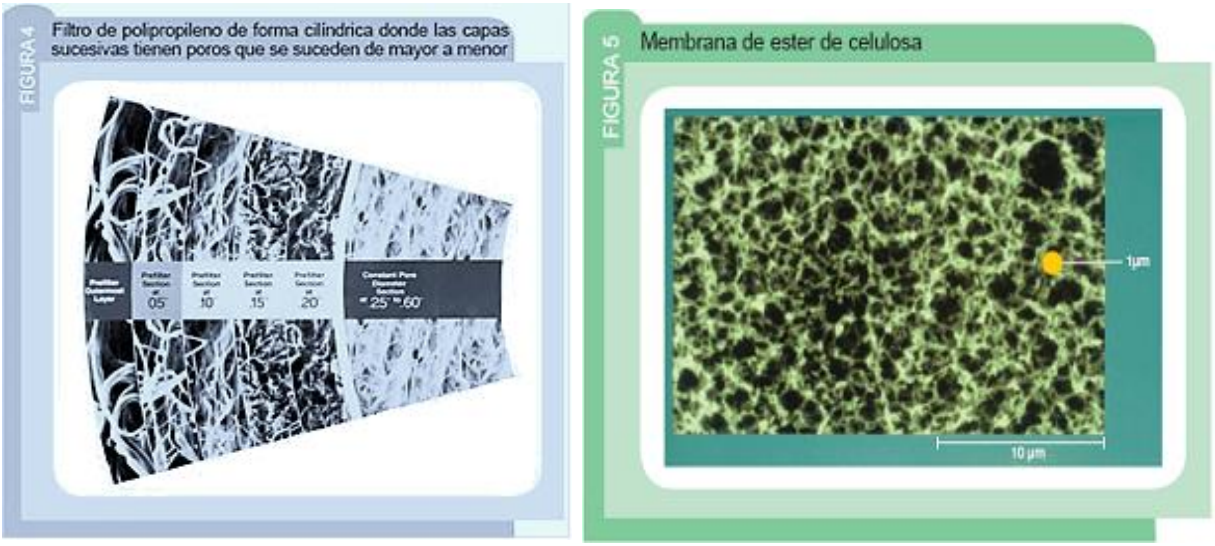


Los filtros de profundidad consisten en fibras depositadas entre sí al azar, que se mantienen unidas permanentemente por medio de adhesivos, fusión, entrecruzamiento, etc. Los intersticios entre fibras constituyen sus poros. La deposición al azar de sucesivas fibras sobre el manto inicial da como resultado una amplia dispersión de poro. Estos filtros tienen el potencial peligro de desprender fibras cuando aumentan las presiones diferenciales.

Las irregularidades en el manto de fibras reflejan su dispersión hecha al azar. Sin embargo su comportamiento mejora al superponer una manta sobre la otra en forma sucesiva (ver Figuras 2 y 3). Las tecnologías más recientes de dispersión de fibras sintéticas por medio de toberas de inyección producen filtros de profundidad por extrusión de polipropileno fundido. Estas toberas extruyen el polímero cuyos hilos son rodeados por aire caliente, soplados, y recolectados sobre un cilindro rotativo. En función del tiempo, de la velocidad, del cilindro, y de la velocidad de desplazamiento de las toberas pueden obtenerse filtros con densidad progresiva de medio filtrante y con fibras más o menos finas.

En el cartucho de la Figura 4 se ve un filtro cilíndrico de polipropileno donde las capas sucesivas tienen poros que se suceden de mayor a menor. Las capas externas actúan como prefiltros de las capas internas. Pese a ser de profundidad, la matriz del medio filtrante se mantiene indeformable.

Figuras 4 y 5



Un material muy usado en la filtración fina, ultrafina y fundamentalmente en los procesos donde se deben retener microorganismos, es la membrana plástica cuya producción industrial se ha desarrollado revolucionariamente desde 1957 hasta ahora, aunque los antecedentes experimentales de este material se remontan al siglo pasado. La palabra membrana no se limita a la definición que da el diccionario como "Hoja o capa fina, blanda y plegable de origen animal o vegetal", ya que en la actualidad se producen muchas estructuras finas microporosas sintéticas compuestas por distintos polímeros

Si bien el desarrollo moderno de las membranas plásticas comenzó alrededor de 1910, algunos investigadores en el siglo pasado y más precisamente en 1840, comenzaron a usar vejigas de cerdos, pericardios vacunos y pieles de cebollas para experimentos osmóticos, diálisis y otros ensayos.

Matteucci y Cima en 1845 fueron los primeros en informar sobre diferencias de permeabilidad relacionadas con la simetría de los poros en membranas animales.

El colodión es el término comúnmente usado por polímeros de la celulosa y consiste en una solución de nitrocelulosa en una mezcla de éter y alcohol o en una mezcla de ácido acético y acetona. Todos los primeros intentos de fabricar membranas de colodión se basaban en la disolución de nitrocelulosa en un solvente, siendo luego vertida en forma de película delgada y plana, formándose un gel con la evaporación de los solventes volátiles. La estructura de los poros se controlaba por el tiempo durante el cual se evaporan los solventes, operación que se interrumpía al lavar esa película con agua.

En 1872 Baranetzky fabricó finas películas de colodión soportadas por papel, vertiendo el colodión sobre planchas de vidrio. Bechhold mejoró el método de Baranetzky haciendo hojas planas de filtros de membranas, impregnando papeles de filtro con colodión disuelto en ácido acético. Halló que la permeabilidad es inversamente proporcional a la concentración de colodión e intentó definir una manera de estimar tamaños de poros y permeabilidad, midiendo la presión necesaria para impulsar aire a través de membranas cuyos poros se hallaban totalmente inundados por agua. Así fue el precursor del ensayo del punto de burbuja que veremos más adelante.

En 1918 Zsigmondy y Bachmann desarrollaron el proceso de verter finas capas de colodión, éter y alcohol sobre vidrios planos, regulando la formación del tamaño de poro al controlar el tiempo de evaporación del solvente durante la etapa de secado. Zsigmondy, siendo Director del Instituto de Química Coloidal de la Universidad de Gottingen, usó celulosa y ésteres de celulosa con los mismos ingredientes básicos que los precursores habían usado para producir membranas de colodión. Mezcló la dilución de derivados de celulosa en un solvente al cual agregó agua, insoluble en la solución, regulando la evaporación de los solventes mediante un lento pasaje de aire en cantidades conocidas y en condiciones de humedad y temperatura controladas.

La empresa Sartorius Werke en Gottingen, de Alemania, desarrolló en forma más completa el proceso de Zsigmondy, y en 1917 comenzó la producción de filtros de membrana en pequeña escala siendo hasta hoy en día Sartorius Werke, una división de la empresa iniciadora, fabricante de filtros.

Figuras 6, 7 y 8

FIGURA 6 Membrana de microfilamentos inorgánicos

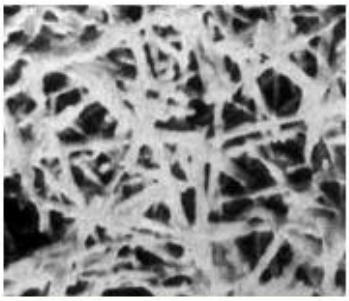


FIGURA 7 Membrana Nuclepore

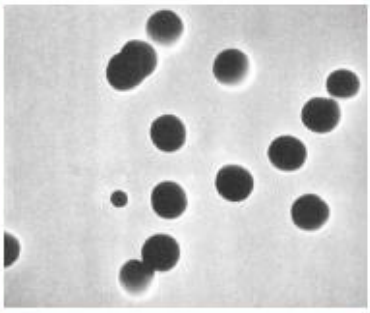
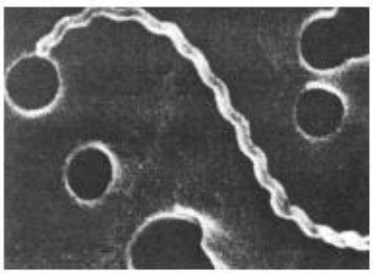


FIGURA 8 Leptospiras sobre membrana



Durante la Segunda Guerra Mundial los alemanes desarrollaron estas membranas para detección de bacterias coliformes y la consecuente enterocontaminación de agua potable. Después de la guerra, la tecnología fue trasladada por el ejército de los Estados Unidos a Fort Dietrick-Maryland, y perfeccionada. Su explotación comercial en EE.UU. se debió a la transferencia de dicha tecnología a una compañía privada.

En el proceso de producción se extrae de la solución del polímero ciertos materiales volátiles cuando una capa fina de solución se desplaza a través de una cámara de ambiente controlado. El resultado es una hoja de material de unos 150 micrones (µ) que tiene una bien definida estructura microporosa como se ve en la Figura 5 (membrana de éster de celulosa). Es de destacar la estructura tridimensional y, muy importante, su gran porcentaje de área abierta (aproximadamente un 80 % de la misma). No se ven poros cilíndricos, pero pese a esas irregularidades el medio funciona como un filtro absoluto, que es uno que depende especialmente del efecto tamiz o de intercepción directa como mecanismo de retención y tiene una excelente integridad.

En función de qué polímero ser use, un amplio rango de compatibilidad química y térmica puede ser obtenido. El éster de celulosa, sin embargo, fue uno de los polímeros más usados para filtración esterilizante. En la actualidad se siguen fabricando membranas de variedades de ésteres de celulosa y de polímeros sintéticos.

El problema que se encuentra con los ésteres de celulosa es su baja resistencia mecánica al plisado profundo, necesario para la producción de cartuchos corrugados, usados actualmente para lograr grandes caudales.

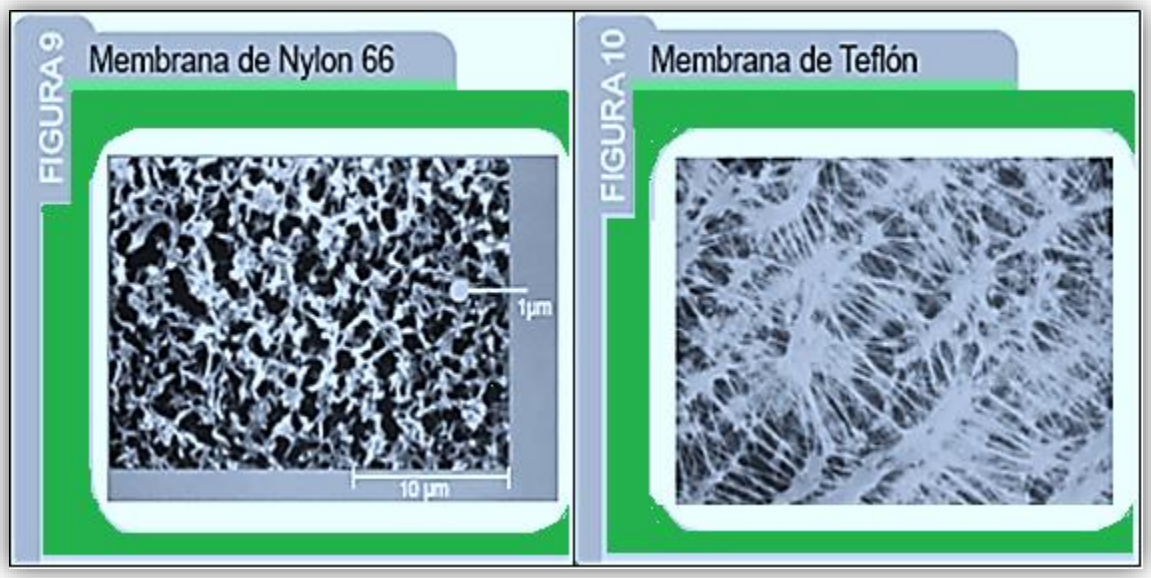
Una membrana utilizada especialmente para la fabricación de cartuchos fue la de microfilamentos inorgánicos, cuya fabricación consistió en la dispersión controlada de microfilamentos soldados entre sí en sus puntos de contacto, llegándose a una estructura indeformable de material cristalino como se ve en la Figura 6. Fue desarrollada al principio de la década del 60, para la fabricación de cartuchos corrugados y su apariencia era la de un filtro de profundidad. Fue discontinuada después de algunos años de uso exitoso pues sobre su materia prima, titanato de potasio, hubo un principio de cuestionamiento de la FDA.

Una variedad de otros polímeros tales como el teflón y el nylon 66, el PVDF, y la poliétersulfona, son usados de manera tal de formar un medio filtrante similar en su estructura al éster de celulosa. Todos ellos admiten ser corrugados profundamente por su alta resistencia mecánica, admitiendo asimismo la esterilización por vapor fluente, ventaja sumamente importante sobre las membranas de ésteres de celulosa que no resisten el reiterado uso de vapor vivo.

Para ejemplificar la importancia de la corrugación de membranas con las que se construyen filtros industriales, debemos mencionar que un elemento de cartucho de 25 cm de longitud y unos 60 mm de diámetro puede tener un área de membrana de hasta 0,9 m^2, por la que pueden circular caudales de soluciones acuosas de 15 l/min. Comparando esta estructura a las membranas de polímeros plásticos se nota una gran similitud en la regularidad de los volúmenes abiertos, en ambos casos aproximadamente 80 a 85% del volumen total y una similitud en la tortuosidad del recorrido que deberá hacer el fluido, no habiendo perforaciones directas o poros.

Otra membrana de desarrollo muy interesante es la membrana nuclear. Esta es una de las más interesantes de las estructuras filtrantes porosas, y es la única que tiene capilares cilíndricos perfectos como contrapartida de las membranas vistas previamente. En su proceso de manufactura la película de policarbonato es sometida a un bombardeo de núcleos atómicos en un reactor nuclear. Las partículas que atraviesan la película dejan huellas residuales que pueden ser atacadas por agentes químicos, en función del tiempo de exposición de la membrana al hidróxido de sodio. El resultado son los capilares cuyo diámetro es función directa del tiempo de exposición al ataque químico, siendo su número función del tiempo de residencia de la película de policarbonato en el reactor (Figura 7). Dado que el bombardeo de partículas nucleares es sin ninguna duda desordenado por naturaleza, uno podría suponer una probabilidad razonable de coincidencia de impactos en zonas contiguas, con lo que la posibilidad de poros sobredimensionados aumenta y, en consecuencia, la posibilidad de pérdida de eficiencia de retención, aunque este efecto puede ser mitigado debido a los diferentes ángulos de incidencia de las partículas nucleares. La membrana resultante es extremadamente fina y resistente. Su apariencia es translúcida y tiene una superficie lisa que la hace especialmente apta para trabajos de estudio al microscopio. Para disminuir la posibilidad de coincidencias de impacto puede bajarse el tiempo de exposición de la película al bombardeo nuclear, lo que implica menor caudal por unidad de superficie que las otras membranas, al disminuirse el volumen abierto. En el caso de la membrana nuclear el volumen abierto es por la razón antedicha del 20% del volumen total, lo que relega su uso al de membranas analíticas, por ser sumamente claras y lisas, aunque los caudales son relativamente bajos (Figura 8).

A partir de 1980 los filtros de membranas de Polihexametilenoadepamida (comúnmente llamado nylon 66) se utilizan en forma cada vez más intensa debido a su amplia compatibilidad química y resistencia mecánica y térmica (Figura 9). La membrana de nylon tiene como desventaja el absorber algunos productos en solución. Para algunas aplicaciones esta membrana lleva un soporte de material no tejido como substrato, de manera tal de tener resistencia a la tracción así como una mayor resistencia cuando se la pliega en la fabricación de cartuchos.



Figuras 9 y 10

En 1981 se desarrollaron las membranas de Difluoruro de Polivinilideno que tienen un alto rango de compatibilidad química y admiten el plisado profundo por lo que se pueden construir cartuchos de gran superficie con ellas. Las membranas de PES (poliétersulfona) tienen grandes ventajas por tener alta compatibilidad química y física y presentar poca adsorción de los materiales a filtrar.

La membrana de teflón, cuya fotografía se ilustra en la Figura 10, se fabrica por el método de estiramiento que consiste en tensionar una película plástica densa de teflón que es estirada en todas las direcciones bajo condiciones controladas de tracción. Como resultado del estiramiento se forman poros en la película plástica cuyo tamaño se controla acotando las tensiones y tiempos con los que este proceso se efectúa. La membrana de teflón, por ser hidrofóbica, es usada principalmente en la filtración de aire en venteos, aire comprimido y gases, o en la de fluidos muy agresivos.

Debemos enfatizar la importancia que ha adquirido en la industria moderna la necesidad de contar con elementos de este tipo, pues en innumerables aplicaciones de la industria farmacéutica, microelectrónica, de fermentación y alimenticia es necesario contar con la provisión de fluidos estériles en caudales importantes. Tenemos en nuestro país casos típicos de filtración de fluidos, en rangos submicrónicos de retención absoluta, con caudales de hasta 30 m^3/h. La única forma simple en que se puede efectuar el filtrado de dichos caudales es por medio de carcasas con múltiples cartuchos dispuestos en paralelo.

Mecanismos de la Filtración Esterilizante. Mitos y verdades sobre las membranas esterilizantes.

Bajo mitos sobre los filtros esterilizantes hemos resumido los siguientes puntos que, como veremos a continuación, no son ciertos como se creía.

1) "*Todo producto filtrado por un filtro esterilizante será necesariamente estéril*". Existiendo microorganismos inferiores en tamaño a *Brevundimonas diminuta*, los filtros esterilizantes validados con las mismas pueden ser penetrados porvirus y por bacterias menores, como *Burkholderia cepacia* y las *Leptospiras*.

2) "*El filtro esterilizante es eficiente independientemente de la carga bacteriana*." Si la carga bacteriana superara las 10^7 /cm^2 no se puede garantizar la esterilidad del efluente.

3) "*El filtro esterilizante tiene todos los poros de 0,2 µ*". El punto de burbuja de los filtros de 0,2 µ varía entre 3 y 4 bar, que corresponde a poros de 0,8 a 1 µ. El punto de burbuja del capilar de 0,2 µ es de 13 bar por lo tanto existen poros de hasta 1 µ.

4) "*Todo filtro de 0,2 µ es esterilizante*". Absolutamente NO. Un filtro esterilizante debe ser identificado por documentos que comprueben que fue calificado por el fabricante con un desafío bacteriológico según la norma ASTM F838-05 y recomendaciones de la FDA. La definición de filtro esterilizante por FDA no menciona micrones.

5) "*Cualquier filtro esterilizante disponible en el mercado es aceptable*". No necesariamente. El filtro esterilizante debe ser seleccionado en base a las características del producto y bajo las condiciones del proceso.

Por mucho tiempo se divulgó el concepto de que las membranas esterilizantes de diferentes polímeros eran tamices perfectos con tamaños de 0,2 o 0,22 µ de poro. Sin embargo, ninguna de estas membranas tiene poros o capilares perfectos de ese tamaño, aunque tienen muchos de tamaños inferiores o similares. Más aún, todas las membranas utilizadas en la industria como esterilizantes tienen poros y capilares distintos, algunos de los cuales superan el tamaño del micrón y sin embargo son esterilizantes, o mejor dicho en la práctica dan efluente estéril. Esta capacidad de esterilizar por filtración está sin embargo limitada por la concentración de bacterias por unidad de volumen de fluido a filtrar y por el espesor de las membranas.

En 1972, Jacobs publicó un trabajo en la revista *Filtration and Separation* [(1)] donde demostraba que la presión de punto de burbuja de 45 psi con la que se efectuaba el ensayo de integridad de las membranas de 0,2 µ correspondía a un capilar de 0,8 µ.

Ensayos de eficiencia bacteriológica

A continuación se discute el concepto de que las membranas no son absolutas ni son solamente de superficie, sino que se evalúan por su capacidad de disminuir las cargas bacterianas, hasta el punto de definirlas como esterilizantes.

El principal mecanismo por el cual las partículas son retenidas en las membranas es el efecto tamiz o de intercepción directa, que es el más importante y otros efectos hacen que partículas se desprendan del medio fluido para depositarse sobre la superficie de la fibra o capilar donde quedan retenidas por adsorción. La adsorción de partículas por la membrana depende de varios factores, como la presión diferencial, la velocidad de pasaje, el pH, etc. La mejor manera de verificar si un filtro de membrana puede producir un efluente estéril es desafiarlo con un gran número de microorganismos y verificar su retención. Este método es un ensayo destructivo que deja el filtro contaminado con microorganismos y cercano al punto de saturación.

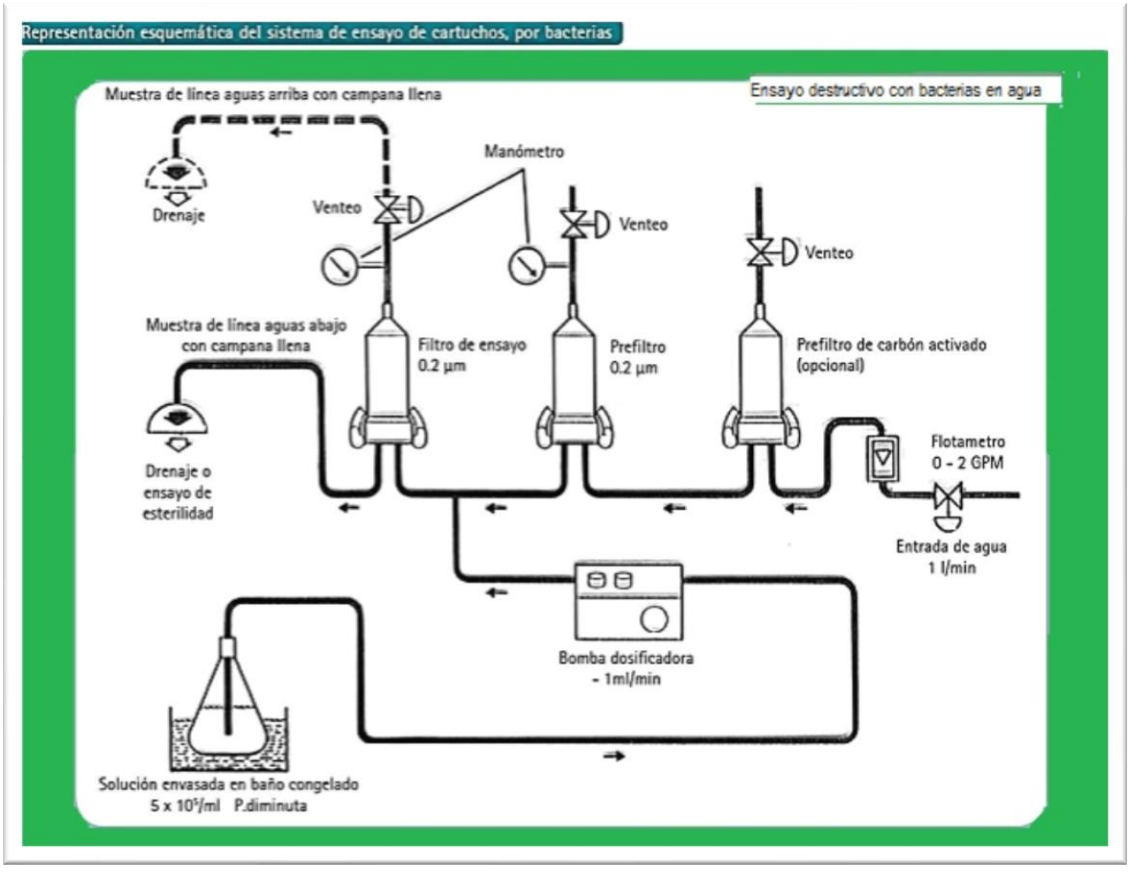
Ensayo con soluciones acuosas

Un ensayo destructivo, usado típicamente en la evaluación de la eficiencia de filtros de membrana, es el de la suspensión de bacterias. Las membranas de 0,2 ó 0,22 µ de tamaño de poro se ensayan con la bacteria considerada de menor tamaño comercialmente disponible que es la *Brevundimona diminuta*, de un tamaño aproximado a 0,3 µ x 1 µ, en una suspensión en agua con concentraciones de 2 x 10^5 a 5 x 10^5 microorganismos por litro, mientras que las membranas de 0,45 µ de poro, se ensayan con suspensiones de *Serratia marcescens*. En la Figura 11 vemos la representación esquemática del circuito de ensayo de cartuchos de membranas de 0,2 µ de poro.

Una solución con una concentración de 5 x 10^5 *Brevundimonas diminuta*/ ml se inyecta a razón de 1 ml/ min a un caudal de agua corriente limpia, desprovista de partículas contaminantes y de cloro, que se bombea a razón de 1 lt/ min hacia el filtro a ensayar. Esta agua se obtiene eliminando primero el cloro por medio de carbón activado y luego eliminando las partículas y bacterias por medio de un prefiltro de 0,2 µ con lo que se inyecta al filtro a ensayar una solución de *Brevundimonas* en agua con una concentración de 5 x 10^5 microorganismos/ litro.

Agua con la concentración arriba escrita se inyecta en forma continua al filtro por un periodo de 2 a 4 semanas hasta el punto de saturación, cuando el caudal de 1 lt/ min no puede ser mantenido y la caída de presión llega a 60 PSI (aproximadamente 4 kg/ cm^2). Se toman muestras del agua efluente a la salida del filtro, muestras que son cultivadas en medios de cultivo. El efluente debe ser continuamente estéril has el punto de saturación inclusive.

Figura 11. Representación esquemática del sistema de ensayo de cartuchos por bacterias.



Téngase en cuenta que al nivel de saturación la membrana de 0,2 µ ocurre cuando se tiene sobre su superficie entre 10^{11} y 10^{12} *Brevundimonas* por pie^2, es decir aproximadamente entre 10^8 a 10^9 ufc/ cm^2 (Ver Figura 11, ensayo destructivo). Sin embargo, es posible ensayar la habilidad de un filtro para ser esterilizante por medio de ensayos no destructivos, correlacionados con los de retención microbiana.

Probabilidad de retención con desafíos de cargas bacterianas

En los casos en que no todos los poros tengan tamaños o estrechamientos que funcionan como tamices, el resultado depende de la probabilidad, pues la captura de la partícula o microorganismo depende de los efectos de inercia, puente, adsorción y velocidad de paso o tiempo de permanencia del microorganismo en el seno de la membrana. Cuanto mayor sea la carga de bacterias por unidad de superficie del filtro, mayor es la probabilidad de penetración. Y a la inversa, cuanto menor es la cantidad de microorganismos menor dicha probabilidad.

Los efectos de la presión diferencial deben ser tenidos en cuenta. Cuanto mayor el tiempo de permanencia del microorganismo dentro del espesor de la membrana, mayor la probabilidad de ser retenida por adsorción. A la inversa, a mayores presiones diferenciales la velocidad de paso será mayor y menor el tiempo de permanencia con lo que disminuirá la probabilidad de ser retenido por adsorción. Por lo tanto la retención por adsorción es probabilística, existiendo una relación inversa entre probabilidad de retención por adsorción con la presión diferencial.

Factor de la carga de microorganismos

La carga de microorganismos por unidad de superficie de filtro afecta la posibilidad de penetración. Por esta razón la carga bacteriana debe ser mantenida tan baja como sea posible. Los filtros tienen eficiencia máxima cuando la carga es mínima. Esta carga deberá ser monitoreada regularmente.

Un factor muy importante es la existencia de poros de tamaños mayores que los microorganismos, que no tienen estrechamientos menores durante la extensión de su capilar. Veremos que mediante el aumento del espesor de la membrana podemos hacer que la cantidad porcentual de dichos poros sea mínima, y tan pequeña como se quiera la probabilidad de penetración.

Ensayo de reducción de concentración de bacterias

Llamaremos Tr a la reducción de concentración, como la relación entre la cantidad de bacterias aguas arriba y aguas abajo del filtro, y su expresión simplificada como LRV:

$$LRV = log_{10}\, Tr$$

Figura 12

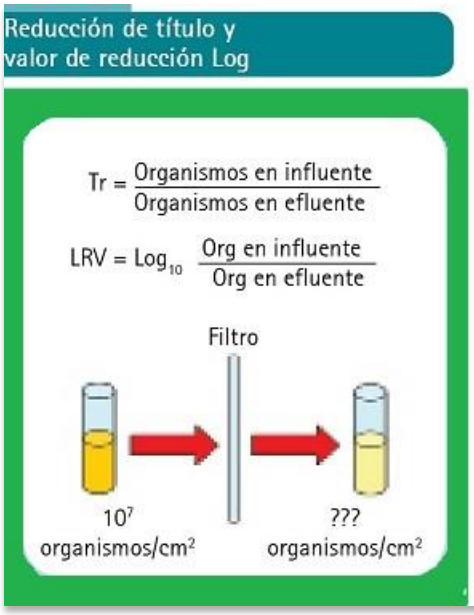
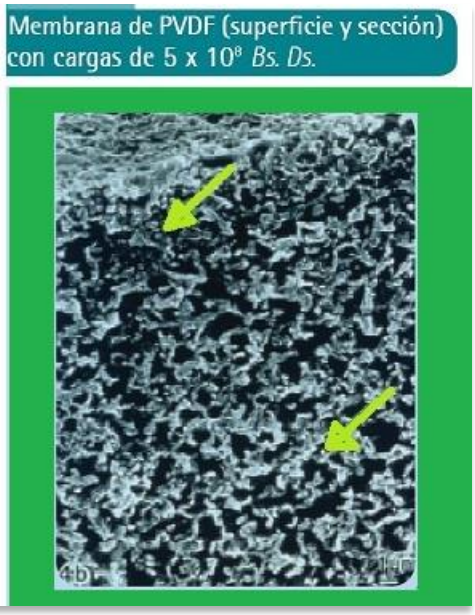


Figura 13



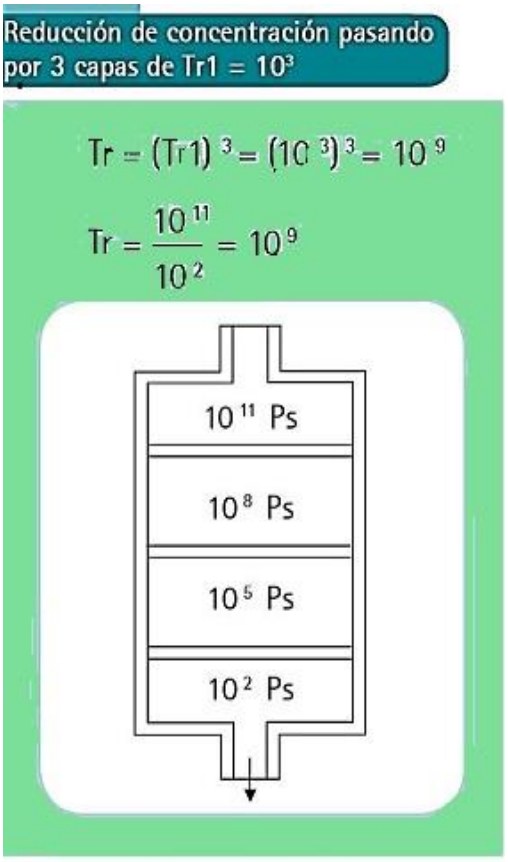
Para una reducción Tr = 10^7, LRV = 7 para el que *B. diminuta* define el filtro esterilizante (Figura 12). Podrá observarse en la fotografía de la Figura 13 que las bacterias que penetran los filtros en su espesor son capturadas a distancias entre 6 y 30 µ de la superficie de entrada. En esta fotografía tomada con microscopio electrónico de barrido se muestra la superficie y sección de una membrana de PVDF de 0,2 µ desafiada con una carga de

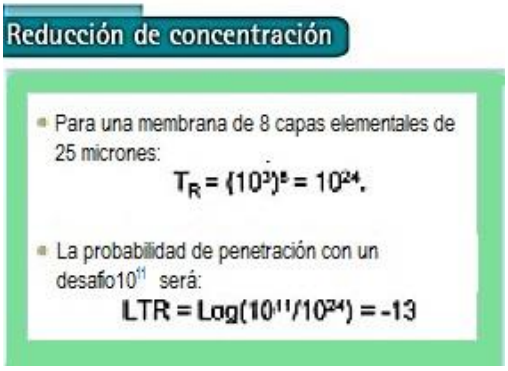
Brevundimonas diminuta y 2 puntos en su sección a los que llegaron bacterias. En junio de 1978 los Dres. Pall y Kirnbauer [2] presentaron un trabajo fundamental en el que demostraron que no habiendo membrana perfecta se podía lograr que la probabilidad de penetración de una sola bacteria puede hacerse tan pequeña como se quiera. Para ello consideraron que las membranas estaban constituidas por capas elementales de 25 µ de espesor; debido a que la mayoría de las membranas tienen espesores múltiplos de 25 µ (125-200 µ).

Con un desafío de 10^{11} bacterias /pie^2 de superficie de cartucho o aprox. 10^8/cm^2, puede ser detectado hasta un microorganismo en el efluente.

Se selecciona *Brevundimonas diminuta* por ser el microorganismo de menor tamaño y aceptado generalmente por la industria. Se considera que en membranas como la tomada en este ejemplo que es de nylon 66 de 0,2 µ, la relación Tr se mantiene constante independientemente de la concentración de bacterias en el influente. Podremos decir entonces para simplificar la deducción que la membrana está compuesta por un número de capas de 25 micrones superpuestas tal que si llamamos Tr1 la reducción de concentración de una capa elemental tendremos para 2 capas que Tr = Tr1^2 para 3 capas Tr = Tr1^3 y para n capas Tr = Tr1^n

Figuras 14 y 15.





En la Figura 14 se ve una carga de *B. diminuta* de 10^{11} y 3 capas elementales cada una de ellas con una reducción Trl = 10^3 que reducen la carga de bacterias sucesivamente a 10^8, 10^5 y 10^2. Lo anterior nos muestra una membrana de espesor insuficiente para ser esterilizante. Si su espesor fuera el doble Tr = Trl^6, la probabilidad de penetración sería entonces:

$$10^{11} / 10^{18} = 1 / 10^7 = 10^{-7}$$

Luego LRV = -7, reducción considerada más que suficiente para ser esterilizante

Usando la ecuación anterior en un ensayo de reducción de bacterias en una membrana de un espesor determinado, podremos calcular su Tr1 para predecir el comportamiento de varias membranas del mismo material, pero de distinto espesor. Por ejemplo, una membrana de 100 µ es decir de 4 capas elementales de 25 µ que exhiban una reducción de concentración de Tr = 10^6.

$$Tr1 = (10^6)^{1/4}$$

Si consideramos una membrana de 8 capas, Tr = Tr1^8 = 10^{12}. Este ejemplo lo damos con el mero propósito de mostrar cómo se hace el cálculo de reducción de concentración total. También llegaríamos al mismo resultado en forma más simple, de la siguiente manera: considerando que 10^6 es una reducción de concentración insuficiente para una membrana esterilizante por permitir una penetración inaceptable, consideremos la colocación de 2 capas del mismo medio en serie:

$$Tr = (10^6)^2 = 10^{12}$$

que es aceptable en soluciones parenterales.

El ejemplo anterior está dado con el mero propósito de mostrar cómo se hace el cálculo de la reducción Tr basado en Trl, pero debo alertar que los valores mostrados son muy inferiores a los reales. Tr1 = 31,6 es muy inferior a los valores reales para membranas esterilizantes de 0,2 µ.

Hay un límite máximo práctico en cuanto al número de microorganismos con los cuales se puede ensayar un filtro. Cuando alrededor de 5 x 10^9 / cm^2 (5 x 10^{12}/pie^2) de *B. diminuta* son retenidas sobre la superficie del filtro, la

permeabilidad de éste ha bajado al mínimo. Por ejemplo, si en un cartucho de nylon de 5 pies^2 se mantuviera desde el inicio de la filtración a 60 psi (menor o igual 4 Kg/cm^2 tendría inicialmente un caudal a filtro limpio de 200 l/ min, pero el caudal bajará a menos de 50 cm^3/min para cuando 5 x 10^9 / cm^2 *B. diminuta* se hayan recolectado.

Para cualquier membrana de nylon 66 de 0,2 µ, sabiendo que su reducción es Tr1 = 7,7 x 10^3 y para un espesor de 150 µ, tendremos:

$$Tr = Tr1^6 = (7{,}7 \times 10^3)^6 = 2 \times 10^{23}$$

Si consideramos su saturación a 2 x 10^{13} *Brevundimonas diminuta* por cartucho de 5 pies^2, la probabilidad de penetración de una sola bacteria filtro saturado será de:

$$(2 \times 10^{13}) / (2 \times 10^{23}) = 1 / 10^{10} = 10^{-10}$$

luego LRV= -10

Número de bacterias para el ensayo

El procedimiento de ensayos con desafío bacteriano es uno con el cual se evalúan los filtros de 0,2 µ y varía con cada proveedor de filtros. Algunos argumentan que ensayar los filtros con más de 5 x 10^7 CFU/ cm^2 de *B. diminuta* cubriría la superficie de la membrana formando una capa. Los Dres. Osumi, Yamada y Toya [3] en 1996 demostraron con fotografías con microscopio electrónico que aún con una carga 50 veces mayor que la norma, la superficie no estará completamente cubierta.

Clasificar los filtros de membrana por un rango de eficiencia, no significa tamaño de poro sino rango de eliminación de contaminantes específicos. Por ejemplo:

0.45 µ: *Serratia marcescens*

0.2 µ: *Brevundimonas diminuta*

0.1 µ: *Acholeplasma laidlawii*

Para determinar si los filtros cumplen los requerimientos mínimos de la FDA, deberán ser usados desafíos mayores. Repetimos una vez más que la eficiencia de retención bacteriana de una membrana está basada en la probabilidad.

El índice que muestra la eficiencia de retención en bacterias Tr se expresa como la relación de concentración de bacterias en el influente con la concentración en el efluente. Este valor refiere a la probabilidad de que una sola célula microbiana penetre la membrana, representando la eficiencia de retención del filtro. También puede representarse como:

$$Eficiencia = (Tr - 1)/ Tr$$

Por ejemplo, si tuviésemos un desafío de bacterias de 10^9 CFU y una concentración de 10 CFU aguas abajo la relación

$$Tr = 10^9 / 10 = 10^8$$

lo que significa que la probabilidad de que una sola bacteria penetre es de 0,000001 % y la eficiencia de retención es del 99,999999 %.

Conclusiones del trabajo del Dr. Osumi

1) Aún cuando una membrana de 0,2 µ sea desafiada a niveles bien superiores a 10^7 cfu/cm^2 la superficie de la membrana no se cubre totalmente con una capa de células microbianas 5 x 10^8/cm^2.

2) La totalidad de las bacterias no fue retenida en la superficie, pero las bacterias no penetraron la membrana a más de 30 µ de distancia de su superficie.

3) El mecanismo de retención microbiana de los filtros esterilizantes de membrana es una consecuencia del efecto tamiz de múltiples capas superpuestas más que un simple efecto superficial.

Si se tiene en cuenta que por definición de la FDA, filtro esterilizante es el que con una carga de 5 x 10^7 microorganismos/ cm^2 da un efluente estéril, los experimentos del Dr. Osumi muestran que las membranas ensayadas la cumplen ampliamente.

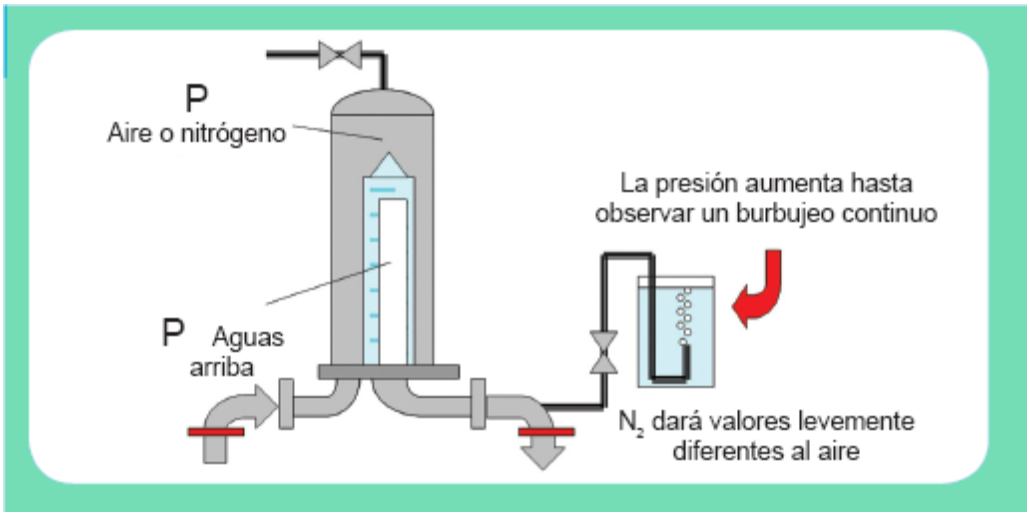
El concepto de la membrana actuando únicamente como tamiz superficial es incorrecto. La eficiencia del filtro de membrana depende tanto de los tamaños de los poros como del espesor, expresado por la ecuación exponencial que relaciona el mismo, con la eficiencia de la lámina de espesor elemental. Es entonces posible desarrollar membranas en la que la probabilidad de penetración sea tan baja, como se quiera.

Ensayos de los cartuchos de membrana y la carga de bacterias

Filtro esterilizante (FDA 1987) [4]: Un filtro que, desafiado con una carga de *Brevundimonas diminuta*, con una concentración mínima de $10^7/cm^2$ de superficie de filtro, producirá un efluente estéril.

La necesidad de contar con un método simple para el ensayo de integridad de las membranas de grado esterilizante llevó a utilizar una propiedad de las mallas porosas, que se llamó punto de burbuja, y que posibilita verificar tamaños de poro con pocos elementos de laboratorio.

Figura 14



Ensayo de punto de burbuja

Si se moja una malla porosa, metal poroso sinterizado, membrana, etc., de manera tal que todos sus poros se encuentren inundados y se la somete a una gradual presión de gas (aire) se llegará a un punto en el que el aire desplazará el agua del poro de mayor tamaño, y se podrá notar un burbujeo continuo (Figura 14). Este punto se llama punto de burbuja y permite relacionar el tamaño de poro con la presión a la que aparece el primer burbujeo continuo.

Esta presión (P) obedece a una fórmula donde influyen no sólo el tamaño del poro (d), sino también la tensión superficial (T) y el ángulo de contacto del menisco líquido (Θ), que depende de la naturaleza del material filtrante así como del líquido (Figuras 15 y 16). Conociendo la tensión superficial, el ángulo de contacto del menisco líquido y el tamaño del poro, Se puede calcular el punto de burbuja, cuando ensayamos materiales de iguales composiciones con el mismo solvente, por ejemplo, agua, ya que:

$$P = \frac{T \times \cos\theta}{d}$$

Figuras 15 y 16

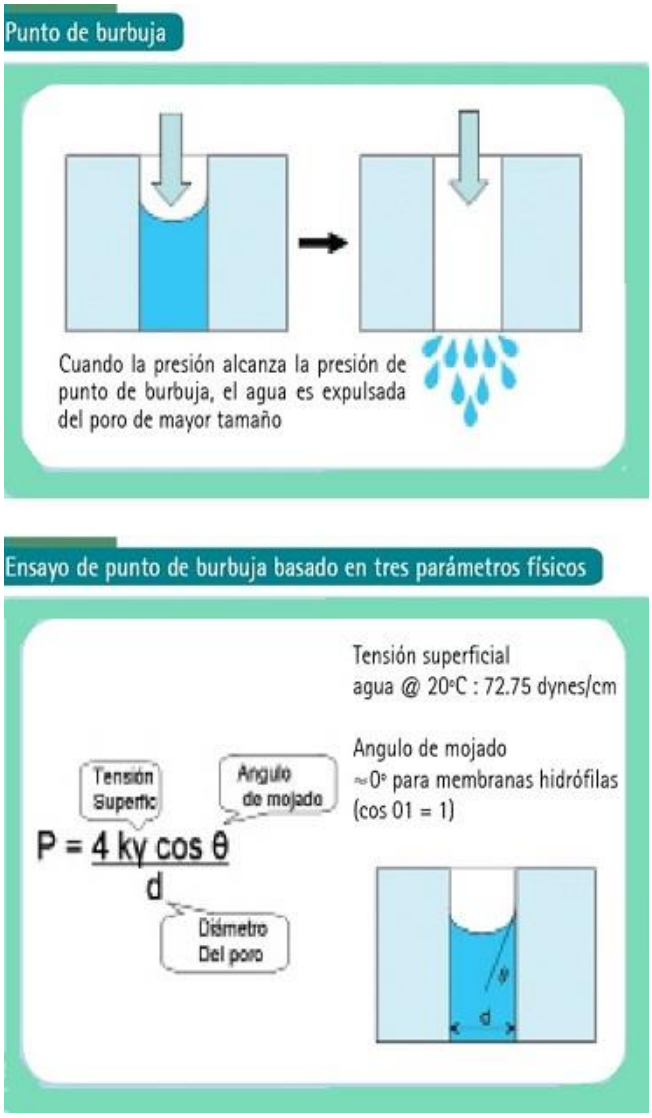
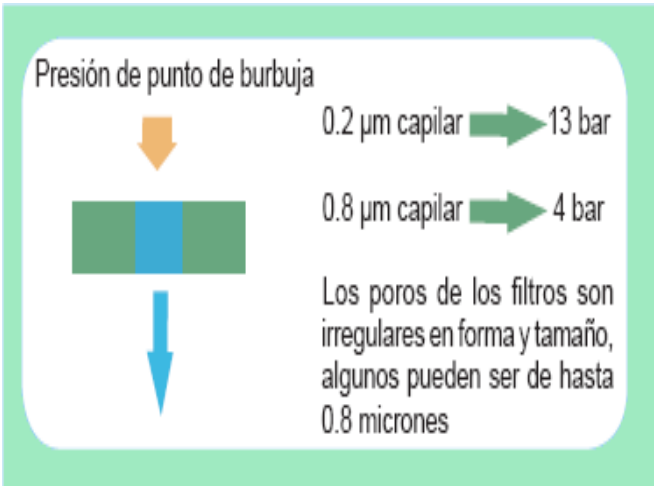


Figura 17



Las membranas validadas como esterilizantes de 0.22 y 0.2 µ tienen puntos de burbuja mojados con agua que fluctúan entre 40 y 50 psi (libras por pulgada^2), es decir cerca de los 2.8 kg/ cm^2 y 3.6 kg/ cm^2 respectivamente.

Es importante destacar que estas membranas no tienen poros uniformes que actúan como tamices perfectos. Tienen en su superficie poros de hasta 1 µ y sin embargo retienen el 100% de bacterias como *B. diminuta*, que se consideran de 0,2 µ por ser de tamaño entre 0.3 y 0.6 µ. Es decir se los llama esterilizantes de 0.2 - 0,22 µ, por su eficiencia de retención en dichos tamaños y no por su tamaño de poro.

La existencia de poros de tamaño de 0.80 a 1 µ ha sido documentada por Jacobs[(1)] quien encontró que a esos tamaños correspondían puntos de burbuja de entre 40 y 50 psi. Si los filtros fueran de poros de máximo tamaño de 0.2 µ, les correspondería un punto de burbuja de 190 psi (Figura 17).

Hay razones para que dichos filtros se comporten como esterilizantes:

1) Los mecanismos de la filtración no son sólo por efecto tamiz, sino influyen también los efectos de inercia y difusión browniana (aunque esto último es fundamental para separación de partículas en gases, no en líquidos).

2) El recorrido largo y tortuoso que debe recorrer la partícula o bacteria a través del espesor de la membrana varía entre 150 y 200 micrones. Estos recorridos tortuosos son superiores entre 1000 y 2000 veces el tamaño de la bacteria.

3) Además de los efectos de retención por inercia hay situaciones de efecto puente. Dos partículas apoyadas una contra otra, bloquean el poro de mayor tamaño (Figura 18). Efectos de atracción electrostática o fuerzas de Van der Waals adhieren a partículas o bacterias a la superficie del capilar, disminuyendo además la sección de pasaje (Figura 19).

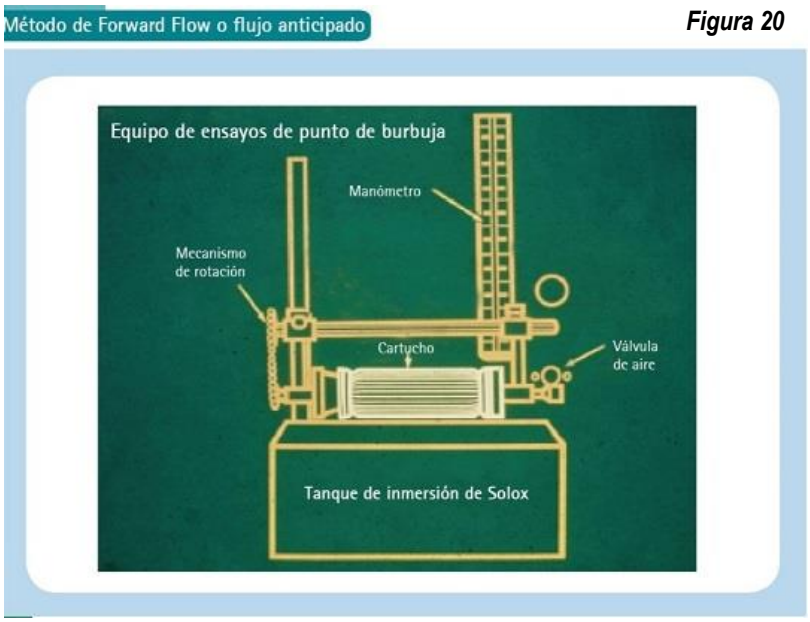
4) Por último la cantidad de poros de tamaños mayores, que no tienen estrechamiento en sus canales internos es mínima, y se puede disminuir aún más con el aumento del espesor de la membrana.

El punto de burbuja manual presenta algunos problemas de interpretación por cuanto depende de la agudeza de la vista del operador, además de otros factores, como la superficie de la membrana en el filtro en ensayo. Debe tenerse en cuenta que cuando previo al ensayo la membrana se sumerge en el fluido se llena con líquido un mínimo del 70% de su volumen. La membrana soporta efectivamente una película líquida. Cuando se aplica aire aún a presiones bajas, el aire en pequeños caudales se difunde a través de los capilares en cantidades imperceptibles al ojo humano cuando se ensaya un filtro de poca superficie (discos de 142 mm ó 293 mm).

En 1975 el Dr. David Pall[5] presentó un trabajo a la PDA donde demostraba que podía usarse un método basado en el flujo difusivo, para certificar la integridad de los cartuchos de membrana, correlacionando los valores de éste con los ensayos destructivos con bacterias. Este método llamado por su autor de "*Forward Flow*", o flujo anticipado al punto de burbuja, provino de observar con microscopio la superficie de cartuchos sumergidos, a los que se daba presión de aire por su núcleo (Figura 20). Con ayuda óptica se detectaron burbujitas a presiones muy inferiores al punto de burbuja. El fenómeno, llamado de flujo difusivo, consiste en la corriente de aire disuelto en el líquido que se desplaza o difunde a través del mismo.

Figuras 18 y 19

Figura 20



Cuando se usan cartuchos de 30" (760 mm) cuya superficie es de 25 pies^2 (2.2 m^2) el caudal de flujo difusivo llega a valores de 36 cm^3/ min. Esto hace que el caudal de aire sea muy alto aún a presiones de 10 psi confundiéndose con el punto de burbuja. De ahí la importancia del desarrollo ideado por el Dr. Pall. Si el ensayo fuera manual lo más previsible sería que el operador, en la suposición que el cartucho esté dañado, lo descarte.

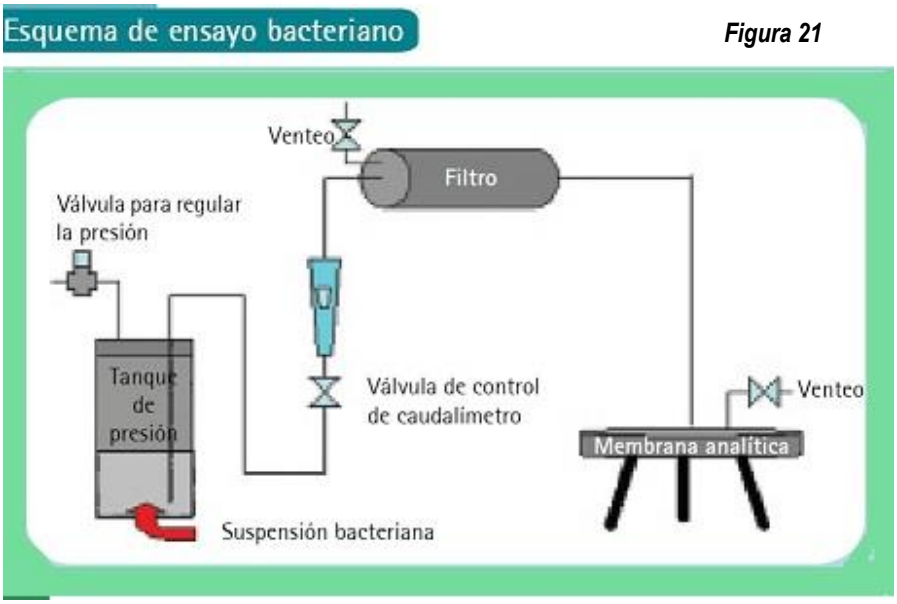


Figura 21

Deberá descartarse el ensayo de punto de burbuja como único ensayo cuando se trate de certificar filtros de alta superficie de membrana. Pero hay que considerar que para definir la eficiencia de los mismos debemos estudiar las peores condiciones posibles. Para ello se consideró ensayarlos con concentraciones de *B. diminuta* con efluente cero (Figura 21). Ya en 1977 Reti de Millipore[6] había relacionado el punto de burbuja de diferentes membranas con el porcentaje de retención bacteriana, viendo que a mayor punto de burbuja medido en psi, mayor era la reducción de la concentración de bacterias. El fabricante de la membrana ha definido mediante ensayos adecuados cuál es el punto de burbuja máximo por encima del cual sus membranas no tienen penetración de bacterias. Definen por este método los valores de punto de burbuja que corresponden a 0.1; 0.2; y 0.45 µ para cada tipo de membrana y para los diferentes fluidos de ensayo: agua, alcohol isopropílico, etc.

En el caso del flujo difusivo se define el flujo máximo, por debajo del cual no se registra penetración de bacterias, con ensayos destructivos.

Ensayo de flujo difusivo. Su metodología práctica

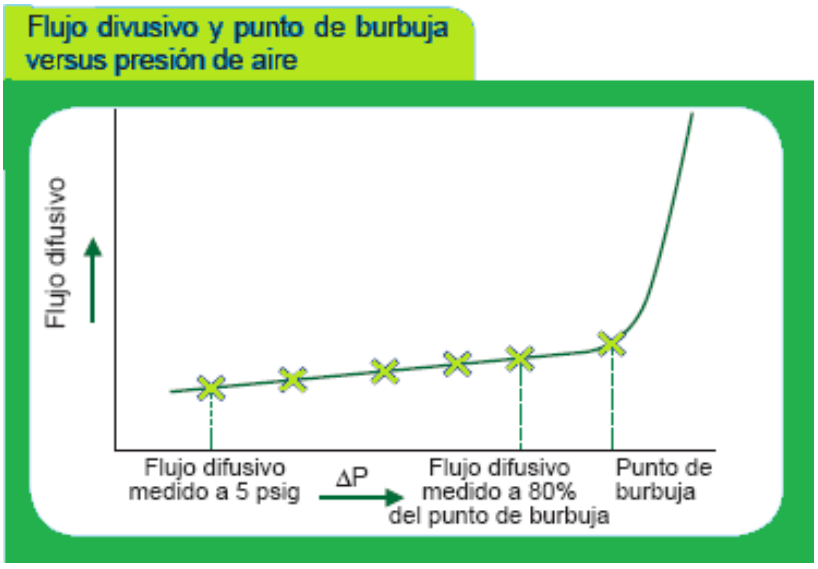
En el trabajo de desarrollo del método, se midió el caudal de aire que pasaba por difusión a través de los elementos, y posteriormente se efectuó el ensayo destructivo con bacterias, determinándose la esterilidad o no del efluente. Se hacen las tablas o gráficos correspondientes viéndose el caudal de flujo difusivo por debajo del cual no hay penetración de bacterias. Se aplica un coeficiente de seguridad y se define el caudal máximo admisible por encima del cual debe descartarse el elemento filtrante (disco o cartucho de membrana). La ventaja fundamental de este método con respecto al punto de burbuja es que en éste los valores son medibles con instrumentos adecuados.

Debe hacerse notar que este método es aplicable a membranas con tamaños de poro pequeños, en las que la dispersión por tamaños es bien conocida reproduciéndose sus características.

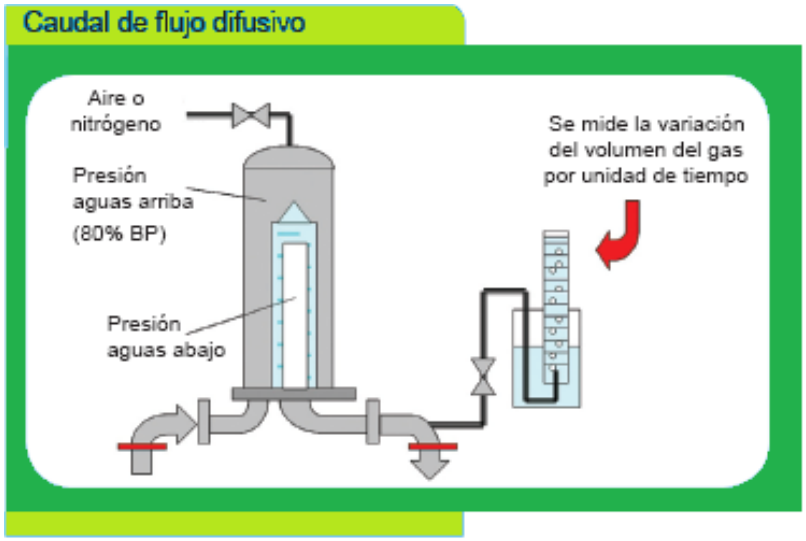
Los valores de caudal de aire en función de la presión se toman normalmente a presiones de entre un 80% al 90% del punto de burbuja (Figura 22). En la figura se ve cómo el caudal de flujo difusivo varía linealmente con la presión, hasta llegar al punto de burbuja, donde, al abrirse los poros de mayor tamaño el flujo difusivo bruscamente aumenta.

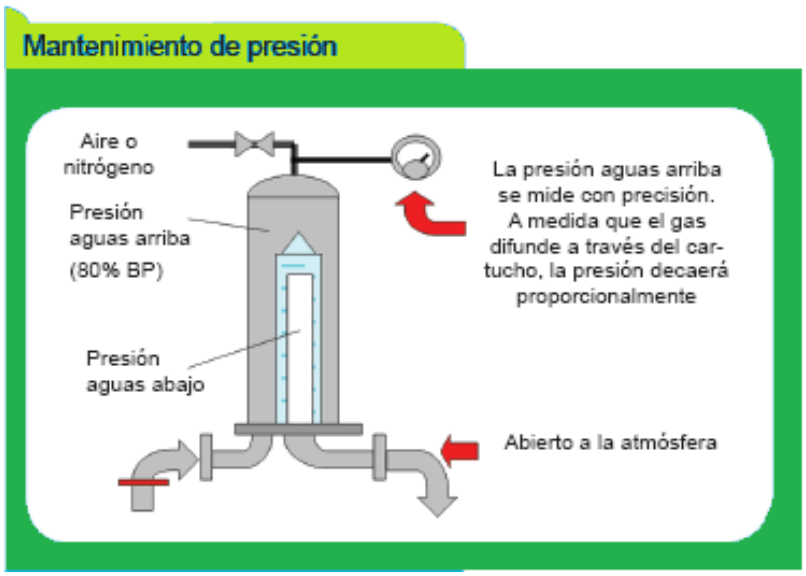
Para evitar equívocos es importante atenerse a los valores dados por cada proveedor para cada elemento, no siendo extrapolables los valores entre membranas de diferentes fabricantes. En cuanto al ensayo en sí, puede efectuarse de dos formas diferentes: por medición del caudal de aire, o por la velocidad de variación de la presión del aire contenido dentro de la carcasa una vez llevado a determinado valor y cerrada la válvula de entrada.

Figura 22



Figuras 23 y 24





En el primer método se inyecta aire a una determinada presión, a la carcasa con el filtro ya mojado instalado, y el aire que lo atraviesa se mide en la bureta graduada como se puede ver en el dibujo de la Figura 23, por el desplazamiento del agua que contiene. Dividiendo el volumen de aire por el tiempo transcurrido se obtiene el caudal difusivo.

En la Figura 24 puede verse el dispositivo usado para la determinación de la integridad de un filtro por la variación de la presión dentro de la carcasa. Una vez colocado el cartucho a ensayar totalmente mojado se inyecta aire a una presión determinada mediante el regulador y el manómetro. Luego se corta la entrada de aire mediante la llave intermedia y se lee la presión en el manómetro de la derecha, después de un cierto tiempo. La diferencia entre ambas presiones, en el tiempo estipulado, está relacionada con el caudal de flujo difusivo, no pudiendo exceder el valor tabulado para el filtro y carcasa utilizados. Es evidente que cuanto mayor la velocidad de disminución de presión, mayor el flujo difusivo que la ocasiona.

Instrumentos automatizados para realizar pruebas de integridad

Para realizar el punto de burbuja, todos los instrumentos operan bajo el mismo principio. Poseen un regulador de presión y un transductor de presión (aparato electrónico que mide presión) y operan del mismo modo que haciendo la prueba manualmente: van incrementando la presión de a “pasos” y miden la caída de presión en un breve período de tiempo. A través de un algoritmo matemático sobre esta caída de presión el instrumento toma la decisión sobre si ese punto de presión es el punto de burbuja.

La Figura 25 tiene el propósito de clarificar conceptos.

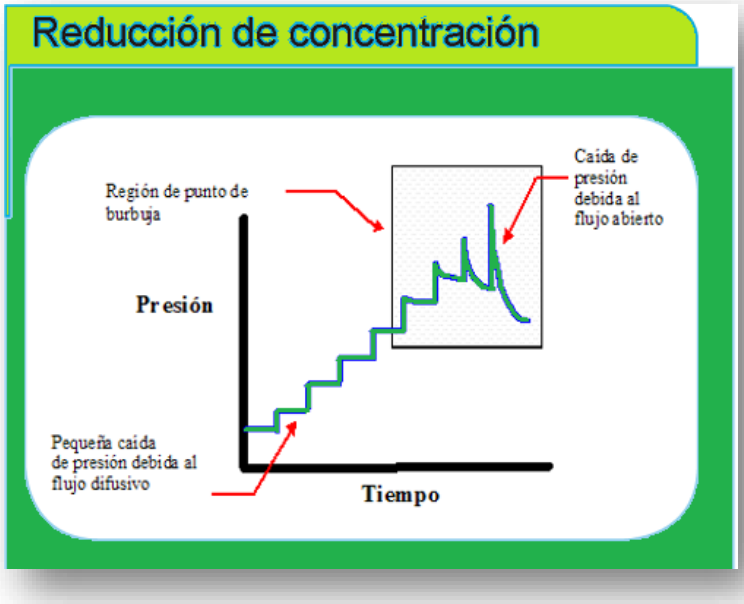


Figura 25

Según el incremento de presión que se les dé a estos “pasos” y el algoritmo matemático usado para medir la caída de presión, tendremos mayor o menor precisión en la medida, y también requerirá de más o menos tiempo para realizarla.

Para efectuar la medida de flujo difusivo, en cambio, los instrumentos tienen diferencias de principios, que permiten clasificarlos en:

• Instrumentos que solo miden presión

• Instrumentos que miden Caudal/ masa.

Los instrumentos que sólo miden presión realizan una medida indirecta del caudal. Alcanzan la presión dada por el fabricante del filtro para la prueba, cierran el sistema por medio de una válvula y miden la caída de presión en el tiempo. Con este dato y basados en la ley general de los gases, a la caída de presión la transforman en volumen.

Con este dato de volumen y con el tiempo medido calculan el caudal y lo comparan con el valor dado por el fabricante del filtro.

Los instrumentos que miden Caudal/ masa, realizan una medida directa del caudal. Poseen al menos un transductor de presión para medir la presión en el lado sucio del filtro, de manera de mantenerla constante en el tiempo, incrementando o disminuyendo el caudal del gas en el sistema. Estos instrumentos que miden caudal/masa frecuentemente requieren de menor tiempo para realizar la medición en virtud de un algoritmo matemático que hace que corte las mediciones dando un resultado de "Pasa la prueba" o "No pasa la prueba" (Figura 26).

El fabricante deberá proveer al usuario la información sobre los valores máximos admisibles para la disminución de la presión en el interior del filtro en el tiempo predeterminado para cada tipo de filtro de membrana, y para cada fluido de ensayo.

Figura 26

La ventaja de este método con respecto al de flujo difusivo es que no se pierde la esterilidad de la conexión.

Aspectos a tener en cuenta:

En estos tiempos, cuando se escribe sobre instrumental específico para realizar pruebas de integridad, deben tocarse los siguientes aspectos:

1. Consideraciones para áreas limpias: La generación de partículas por estos instrumentos debe minimizarse cuando se utilizan en áreas limpias.
Debido a que los artefactos electrónicos para operar correctamente deben trabajar en un rango de temperaturas, los instrumentos para medir integridad de filtros deben "refrigerar" de algún modo su sistema y en estos casos es mejor que se usen disipadores en lugar de ventiladores, pues estos últimos pueden influir en la medición de partículas en el área.
De tener que imprimirse un resultado, es conveniente que tengan impresoras de papel térmico (no producen impacto sobre el papel) en lugar de matriz de puntos u otras que pudiesen generar "pelusas" de papel por el impacto ocasionado.
La protección contra la contaminación no es un tema menor en esta clase de instrumentos. Algunos de ellos poseen válvulas de venteo externas para este fin, otros poseen sistema "limpiables", otros trampas de agua y sólo algunos combinan estos sistemas de protección.

2. Código de barras: La nueva generación de filtros poseen códigos de barras para evitar errores, con lo cual es necesario que los instrumentos sean capaces de leerlos. El instrumento una vez leído el código debiera seleccionar un programa predefinido de prueba de integridad, disminuyendo riesgos del operador en carga de datos o selección de programas.

3. Protección contra salpicaduras: Las distintas clases de protección fijan, en qué medida se puede exponer un aparato eléctrico en condiciones ambientales adversas, sin ser dañado o sin representar un riesgo de seguridad o para la salud. Los grados IP (Ingress protection /Protección contra ingreso) respecto a los agentes ambientales y humanos, externos a los dispositivos eléctricos se denominan mediante la codificación IP XX (XX son dos números). Si un instrumento tiene grado IP54 está protegido contra polvo e inyecciones de agua proyectadas desde todas direcciones. En esencia no queremos que el instrumento ante una simple salpicadura o al "limpiarlo" adecuadamente nos deje de funcionar.

4. 21 CFR part 11: Esta regla tiene por objetivo establecer requisitos para la grabación de datos electrónicos y el uso de firmas electrónicas. En esta norma se establece que el riesgo de la falsificación, interpretación equivocada o cambios sin dejar evidencias son más altos con los registros electrónicos y firmas electrónicas que cuando se hacía en papel y firmas autógrafas. Por lo tanto para minimizar estos riesgos se requieren controles específicos como son:

- **Seguridad de acceso:** los sistemas deben limitar el acceso al personal calificado y autorizado
- **Firmas electrónicas:** los resultados de las pruebas son firmadas electrónicamente por el operador (PIN y password). Los sistemas deben establecer medidas que aseguren que el uso de estas firmas esté limitado a los dueños genuinos.

Puntos destacados que deberían incluirse en los instrumentos para ser conformes con esta norma:

- **Expiración de password:** la expiración de un password dado en un tiempo determinado
- **Mínima longitud del password:** setear a un mínimo de 4, 6 u 8 caracteres
- **Bloqueo del sistema:** Cuando las combinaciones de usuario/password sean falsas debe bloquearse el sistema y ser reabierto sólo por el administrador.

Bibliografía

1. S. Jacobs. "*The Distribution of pore diameters in graded ultrafine membranes*", Filtration & Separation September/October 1972, page 525
2. D.P. Pall and E.A. Kirnbauer. "*Bacterial Removal Prediction on Membrane Filters*" 52nd Colloid & Surface Science Symposium of Tennessee, June 12 (1978) Pall Corp. Publ. STR #PUF13
3. Masako Osumi, Naoko Yamada and Mida Toya. "*Bacterial Retention mechanisms of Membrane Filters*", PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. Volume 50. Enero/Febrero 1996
4. Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing. FDA (1987).
5. David B. Pall. "*Quality Control of Absolute bacteria Removal Filters*". Bull of Parenteral Drug Assoc. 1975 page 192-204
6. A.R. Reti de Millipore Corp. "*An assessment of test criteria in evaluating the performance and integrity of sterilizing filters".* Bull Parenteral Drug Association 31(4): 187-194. (1977)

Bibliografía adicional:

G. Howard y R. Duberstein. "*A case of penetration of 0,2 micron rated membrane filters by bacteria".* Journal of Parenteral Drug Association. 1980, page 95

Capítulo II.3.

Indicadores de esterilización

Russ Nyberg (q.e.p.d.).

Revisado y acualizado por Mónica Lagomarsino

Introducción

El uso de Indicadores Biológicos

Resistencia de las esporas

Uso de un Process Challenge Device (PCD)

Uso de IB en recipientes con líquidos

Uso de IB no tradicionales o especiales.

Esterilización de residuos provenientes de un laboratorio de Microbiología.

Indicadores de lectura rápida

Calificación de Desempeño de los IB.

Uso del BIER Vessel

Medios de recuperación

Utensilios de laboratorio / Personal y Técnica

Bibliografía

Introducción

Se utilizan indicadores de esterilización durante el proceso de validación de los ciclos de esterilización, y luego para el monitoreo de los ciclos validados para que, junto con el resto de los parámetros registrados del ciclo, se pueda asegurar la esterilidad de la carga.

Hay varios tipos de indicadores, como simples cintas adhesivas que cambian de color cuando se somete a la temperatura de esterilización, como papeles que contienen líneas o dibujos con tintas sensibles, que en envoltorios especiales pueden detectar que el vacío del ciclo puede quitar los bolsones de aire de los envoltorios para luego reemplazar esos espacios con vapor que permitirá la esterilización (test de Bowie & Dick), así como los indicadores biológicos y los integradores químicos, de los cuales nos ocuparemos. Ver integradores químicos bajo el título “Indicadores de lectura rápida”.

El uso de Indicadores Biológicos.

Actualmente se utilizan diferentes modelos de Indicadores Biológicos (IB) para la validación y el monitoreo de los ciclos de esterilización por vapor de numerosos productos farmacéuticos y materiales a utilizar tanto en producción como en control microbiológico. Estos IBs incluyen suspensiones de esporas cuantificadas o tiras conteniendo esporas adheridas, o los llamados indicadores auto-contenidos. También se puede añadir la suspensión de esporas directamente al producto a esterilizar.

En el año 2001 se comenzó a observar un evidente incremento en el uso de suspensiones de esporas y de indicadores auto-contenidos en desmedro de las tiras con esporas, y en especial para monitorear cargas líquidas esterilizadas por vapor, quizás con el fin de reducir el número de falsos positivos debidos a la contaminación por el manipuleo posterior a la esterilización, pero también porque éstos requieren menores períodos de incubación. La contaminación posterior a la esterilización se reduce drásticamente con el uso de los IB auto-contenidos; y por la suspensión de esporas en ampolla de vidrio sellada. Sin embargo, quizás lo más importante es que con estos indicadores en ampollas pueden obtenerse resultados mucho más precisos y útiles cuando se utilizan en ciclos con cargas líquidas.

Resistencia de las esporas

Cuando una suspensión cuantificada de esporas se utiliza para validar un ciclo de carga líquida, se puede añadir dicha suspensión directamente al producto que va a ser esterilizado o en contenedores que simulan el producto, y se colocan en diversos lugares de la cámara. En el caso que se agregue la suspensión directamente en el producto, habría que considerar el efecto de dicho producto sobre las esporas. Este ensayo puede proporcionar información importante acerca de la resistencia de las esporas cuando están en contacto con el producto que va a ser esterilizado.

En la mayoría de los casos la resistencia provista en el certificado de una suspensión de esporas o de las tiras, estará determinada por el Valor D.

La resistencia declarada de las esporas en la suspensión probablemente será muy diferente a la obtenida si las esporas se colocaran en el producto real que va a ser esterilizado. Tanto el producto como el envase que lo contiene pueden afectar la resistencia de las esporas a la esterilización. El volumen de producto, su composición, su viscosidad y el material del envase influirán en la resistencia. Esto quiere decir que todos estos factores influyen en la velocidad de transferencia térmica o de calor, aumentando o disminuyendo el tiempo necesario para producir la letalidad de las esporas lo cual afectará la resistencia.

Producto ensayado	Material de envase	Volumen de llenado	Valor D a 121ºC
#1	Polipropileno	40 ml	3.2 minutos
#2	Polipropileno	50 ml	4.5 minutos
#3	Polipropileno	50 ml	**1.6 minutos**
#4	Polipropileno	50 ml	1.9 minutos
#5	Polipropileno	50 ml	4.0 minutos
#6	Vidrio	50 ml	3.0 minutos
#7	Vidrio	50 ml	4.4 minutos
#8	Vidrio	50 ml	**8.0 minutos**
Agua para Inyectables	Vidrio	100 ml	3.3 minutos
Agua deionizada	Vidrio	100 ml	2.7 minutos

***Tabla 1**. Valor D*

Esta información ha sido previamente publicada en Journal of Validation Technology[1]

Con el fin de ilustrar el efecto del producto y de su envase sobre la resistencia de las esporas, se han inoculado varios productos similares con esporas procedentes del mismo cultivo de *Geobacillus stearothermophilus*. Estas se utilizaron también para inocular tiras de papel a modo de referencia. Se determinó la resistencia de las esporas en las tiras a 121 ºC, siendo el valor D obtenido de aproximadamente 1,0 minuto. Los productos en análisis estaban

envasados o en vidrio o en polipropileno. La viscosidad de los productos seleccionados y sus volúmenes de llenado eran diferentes entre sí. Cada uno de los diez productos ensayados se inoculó con la misma población de esporas, obteniéndose así 10 diferentes valores D a 121 °C. Estos valores D fueron calculados para cada producto utilizando el Método de Curva de Supervivencia. La Tabla 1 proporciona los resultados obtenidos de valor D.

Para los siete productos ensayados con un volumen de 50 ml, los valores de D variaron entre 1,6 y 8,0 minutos. A menos que las pruebas de resistencia se lleven a cabo dentro del producto, no podría conocerse la resistencia real de un ciclo. Por lo tanto, el valor de resistencia que figura en el certificado no se debería utilizar para usar dentro del producto, ya que dicho valor indicado de resistencia tiene poco valor, excepto que sea utilizado para comparar tendencias. Tal validación no proporciona documentación de la resistencia del IB en el producto que se va a esterilizar, a menos que se realice un estudio similar al ilustrado anteriormente. El valor D puede no aumentar como se esperaba, creando así un desafío mayor. En algunos casos, la resistencia puede caer por debajo de lo que podría considerarse un desafío mínimo. Es necesaria la existencia de estos datos para demostrar que las esporas usadas fueron un desafío significativo para el producto ensayado. El conocimiento de estos datos puede proporcionar información importante acerca del ciclo y que puede ser utilizada para determinar la letalidad y el Fo acumulado. (Fo es una medida de la capacidad de inactivación microbiana de un proceso de esterilización. Ver el capítulo de esterilización en este manual).

Uso de un *Process Challenge Device* (PCD)

Una vez que se conoce la resistencia de las esporas, o que se haya desafiado su resistencia en el producto, se puede utilizar un dispositivo que evalúe para los IB o indicadores químicos la efectividad de la penetración del esterilizante en un proceso de esterilización. Dicho dispositivo (PCD o *process challenge device*) debe ofrecer mayor o igual resistencia que el producto real a esterilizar, aunque no tiene por qué parecerse al producto, sino que debe simular la "resistencia" a la esterilización. Si un laboratorio ha determinado y comprobado que su producto inoculado tiene un valor D a 121 ºC de 1.8 minutos, se puede elegir un IB que tenga un valor D de 1.9 minutos o mayor de resistencia con el PCD, para evitar la inoculación directa del producto. Esto tiene una gran ventaja respecto del riesgo relacionado con la inoculación directa del producto.

Si se elaboran viales de 4 ml de un producto líquido, se puede enviar una adecuada cantidad de la solución y unidades usadas en el empaque primario (viales, tapones y precintos) a un laboratorio que cuente con un BIER *Vessel* (*Biological Indicator Evaluator Resistometer*) para determinar el valor D de las esporas en el producto (ver más adelante). Previo a la determinación de valor D, es conveniente que el laboratorio efectúe un estudio de inhibición del producto inyectable y la determinación de la recuperación de esporas utilizando un método validado. Para ello los viales de producto son inoculados con una cantidad conocida de esporas de *G. stearothermophilus* (si el proceso de esterilización es por vapor), por lo general 6 logs, y luego se exponen a varios ciclos de esterilización en el BIER *Vessel*, y se determina la Fracción negativa del Valor D. Ahora que se conoce el valor D del producto real, **no es necesario efectuar la inoculación directa en el producto**. Un CPD adecuado puede ser utilizado en los ciclos futuros, y gran parte del trabajo de laboratorio relacionado con la inoculación del producto puede ser eliminado.

Uso de IB en recipientes con líquidos

Es el caso por ejemplo de los recipientes con medios de cultivo. El uso de esporas en tiras de papel para monitorear o validar los ciclos con cargas de líquidos, puede proporcionar información acerca de la cámara pero no controla lo que está ocurriendo realmente dentro de la carga líquida. Colocando las tiras de papel de esporas en diversos lugares en la cámara o colgando las tiras con cinta adhesiva en el interior de los contenedores no se monitorean las condiciones en el seno del líquido. La cámara puede permanecer a 121 ºC durante quince minutos o más antes de que el líquido alcance los 121 ºC. Un ciclo de 15 minutos a 121 ºC puede matar las esporas de las tiras colocadas en la cámara, pero sin embargo el líquido pudo haber sólo alcanzado los 121 ºC durante 1, 2 ó 5 minutos, o ni siquiera haber alcanzado dicha temperatura. Las esporas en las tiras pueden haber muerto, pero sin embargo la carga no estará estéril. La carga pudo incluso no haber llegado a 100 ºC en esos 15 minutos. Colocar las tiras de esporas dentro del líquido a esterilizar es también inapropiado. Este sería un ejemplo del uso "no previsto" de tiras con esporas, ya que la prueba de resistencia proporcionada con la mayoría de las tiras de papel se determina en tiras secas con un BIER *Vessel* en una condición de buena calidad del vapor, lo cual no puede ser comparado con la resistencia obtenida sumergiendo las tiras en un líquido. Se entiende que una pobre calidad

de vapor o "vapor húmedo" creará condiciones diferentes dentro de la cámara. El vapor húmedo altera la resistencia de los IB por disminución de la eficacia de la transferencia de calor y por tanto alarga el tiempo de exposición necesario para matar las esporas contenidas en los IB.

Em este caso debe utilizarse un indicador biológico diseñado para dichas cargas líquidas. En la Figura 1 se muestran varios IB en ampollas de vidrio selladas disponibles de distintos proveedores. Los IB en ampollas de vidrio están diseñados para ser introducidos en el líquido que va a ser esterilizado. En la Figura 2 se muestra la colocación de ampollas dentro de varios recipientes con distintos volúmenes [(2)]**.** Los fabricantes de indicadores biológicos proporcionan IB en la forma de ampollas de vidrio en una amplia gama de tamaños y volúmenes de entre 1 ml y 4 ml por vial o aún mayor. Estos IB suelen contener un número cuantificado de esporas bacterianas por ampolla, una cantidad de medio de cultivo líquido y un indicador de pH para que sea más fácil la observación del crecimiento dentro de la ampolla debido a un cambio de color.

La resistencia de los indicadores en ampollas está determinada por la ampolla de vidrio sellada como una unidad. Cuando se la coloca en un líquido que va a ser esterilizado, independientemente del tipo de líquido o de su viscosidad, la ampolla aún mantiene la misma resistencia que la que indica el certificado. Sin embargo el volumen del líquido, su viscosidad, la posición de la ampolla dentro del recipiente y el envasado afectarán la velocidad de transferencia de calor.

La ampolla nunca debe estar en contacto directo con vapor de agua, no es el vapor el causante de la letalidad, sino que el vapor actúa como transportador de energía, o transfiere el calor que causa la letalidad desde el vapor al líquido, luego al vidrio de la ampolla, luego al líquido que está dentro de la ampolla y finalmente a las esporas en suspensión.

Figura 1*. Varios IB en ampollas de vidrio*

Figura 2. *Ampollas colocadas en el seno de líquidos.*

Como un ejemplo de la importancia de la colocación apropiada de los IB dentro de un líquido que va a ser esterilizado, la Figura 3 muestra un gráfico de la temperatura de varias zonas de un recipiente de un volumen de 2 litros que se esterilizó a 121.1 ºC.

En este gráfico se representan 5 termocuplas (TC) que fueron utilizadas para registrar las temperaturas del líquido y la cámara durante el ciclo de esterilización. La línea # 1 representa la temperatura del líquido en la zona superior del Erlenmeyer. La línea # 2 es la TC posicionada ligeramente más abajo, hasta llegar a la línea # 4 que representa la TC posicionada en el área más inferior del recipiente. La línea # 5 grafica la TC en la cámara del autoclave. La línea # 1 indica que la zona superior del líquido alcanzó los 121,1 °C aproximadamente a las 14:18:40, 14 minutos después que la cámara llegó a dicha temperatura. Si este ciclo hubiese estado seteado para un tiempo de

esterilización de 15 minutos, el área superior del líquido hubiese estado a una temperatura de 121 °C durante aproximadamente 1 minuto, en cambio la TC # 4 no alcanzó esa temperatura hasta aproximadamente 14:28:20, o sea 10 minutos después que la TC#1. Una ampolla situada cerca de la superficie del líquido o flotando en él, puede indicar esterilización demostrando “no crecimiento”, pero no una ampolla colocada en el fondo.

Figura 3. *Lectura de las termocuplas*

La velocidad o el tiempo necesario para la transferencia de calor de manera que el líquido alcance una temperatura de 121 °C condicionan el tiempo de exposición necesario para producir la letalidad. Si la ampolla tiene una resistencia de 2,0 minutos a 121 ºC, la resistencia de las esporas no va a cambiar cuando se la sumerge dentro del líquido. La resistencia de las esporas en la ampolla se mantendrá en 2,0 minutos a 121 °C. Una vez que el ciclo ha comenzado, el tiempo necesario para que el producto alcance los 121 ºC sin duda variará dependiendo de la configuración del recipiente que lo contiene. Sin embargo, si las esporas del IB son destruidas durante el ciclo y el IB fue correctamente colocado, aún restan 2.0 minutos a 121 ºC para la muerte de las esporas del IB. La importancia de esto es que la exposición necesaria determinada para producir letalidad ahora se puede utilizar para documentar que una población certificada con un valor D conocido desafiada fue destruida en ese ciclo en la zona más difícil de esterilizar. En esta situación, el factor de resistencia es conocido y la reducción logarítmica puede ser determinada y documentada. Este factor conocido de resistencia es muy importante y forma parte del desarrollo y la validación de un ciclo de esterilización. Esta información puede utilizarse para el seguimiento de los futuros ciclos con carga de líquidos.

Mientras que las esporas soportadas en tiras siguen siendo el tipo más utilizado de IB para el monitoreo de los ciclos de esterilización por vapor, en las cargas de líquidos los IB auto-contenidos sellados y las suspensiones de esporas proporcionan información precisa sobre el nivel de aseguramiento de la esterilidad de los líquidos esterilizados.

Uso no tradicional o uso especial de los IB.

Existe una amplia variedad de materiales de soporte o *carriers* en uso, dependiendo del método de esterilización y el elemento a esterilizar. Se puede optar por diferentes materiales de soporte, incluyendo alambres de acero inoxidable, hilos de algodón, discos de fibra de vidrio, mini tiras de papel, tiras y discos de metal, así como soportes de plástico.

Esos IBs están calibrados al igual que las tiras de papel, y el Certificado de *Performance* proporciona información sobre el valor D, la población y el tiempo de Sobrevida / Muerte de acuerdo con la Farmacopea de Estados Unidos (USP).

Con ayuda de instrumentos con diámetros muy pequeños los fabricantes están tratando de utilizar para la verificación de la esterilización, IB nuevos y más delgados o más pequeños cuando es necesario. La selección de un IB adecuado para un determinado método de esterilización es de suma importancia. Ya no es aceptable usar una tira de esporas en un lugar determinado, sólo porque no hay IB más pequeños. Muchas de estas configuraciones especiales de IB para uso industrial están disponibles para VHP (Vapor de Peróxido de Hidrógeno), para vapor y para calor seco con el microorganismo de prueba adecuado, ya sea *G. stearothermophilus* o *Bacillus atrophaeus*.

Esterilización de residuos del Laboratorio de Microbiología

Aproximadamente el 75 a 80% de todas las instalaciones de tratamientos de residuos externos de los laboratorios de Microbiología utilizan la esterilización por vapor como método de tratamiento de residuos. La esterilización por vapor también es comúnmente utilizada en los laboratorios ubicados en la industria farmacéutica para tratar sus residuos. Muchas de esas instalaciones son monitoreadas periódicamente con IBs para determinar la eficacia del proceso de esterilización, tal como lo requieren las agencias regulatorias. Los IBs más comúnmente utilizados para el monitoreo de los ciclos por vapor son las tiras, o los indicadores auto-contenidos en pequeños contenedores de plástico rompibles.

Para controlar los ciclos de esterilización, se pueden colocar tiras con esporas directamente en la bolsa de desechos antes de la esterilización. Luego de finalizado el ciclo las tiras de esporas se remueven y se transfieren asépticamente a un tubo conteniendo medio de cultivo. Luego el medio se incuba para determinar si hay o no crecimiento. La transferencia de las tiras al medio de cultivo se debe realizar en un sitio adecuado para no tener falsos positivos. Los resultados de las pruebas deben ser documentados y los registros deben mantenerse como evidencia de que el control de la esterilización se ha efectuado. Ver Figura 4.

Figura 4. *Tiras con esporas tubos con medio de cultivo.*

Gran parte de los residuos microbiológicos en un ciclo de esterilización de residuos puede consistir en placas de Petri con medio agarizado, tubos inclinados o *slants*, medios de cultivos de deshecho y placas que han sido utilizadas para valoraciones microbiológicas, junto a otros elementos que pueden fundirse o derretirse provocando fugas de su contenido líquido en la bolsa de residuos durante su esterilización. Estos líquidos a menudo penetran en el envase del indicador o sobre el envase plástico del indicador auto-contenido. Esa situación puede complicar retirar los indicadores del interior de la bolsa.

Si el agar líquido fundido entra en contacto con las tiras que contienen esporas, la *performance* real del indicador puede verse comprometida, ya que las tiras no están diseñadas para ser usadas en ciclos similares a las cargas líquidas. Los pequeños indicadores auto-contenidos también pueden revestirse con los desechos líquidos, también comprometiendo la eficacia del indicador.

Una vez más, para este uso es necesario un tipo de IB adecuado: los Indicadores en ampollas de vidrio que han sido diseñados específicamente para ciclos donde los líquidos están presentes. Simplemente se inserta la ampolla dentro de la bolsa y se ejecuta el ciclo de esterilización. Al completar el ciclo la ampolla se retira de la bolsa usada para la decontaminación de materiales y se coloca directamente en la incubadora. ¡Esterilizar e incubar!. Otros pasos no son necesarios. El medio de cultivo contenido en la ampolla contiene un indicador de pH para que, durante la incubación, si hay desarrollo de bacterias se detecta cambio de color púrpura brillante a un color amarillo brillante. Si el ciclo de esterilización se ha realizado correctamente, la ampolla se mantiene de color púrpura. El tiempo de incubación necesario para la mayoría de estos tipos de ampollas es de 48 horas. La porción superior de la ampolla tiene un cuello en que se puede colocar una cadena larga o un alambre o cuerda para colgar la ampolla y así colocarla dentro de la bolsa para decontaminar con la cadena colgando fuera de la bolsa. Cuando el ciclo ha terminado, la ampolla se recupera tirando de la cuerda. Ver Figura 5. La ampolla luego se limpia y se coloca directamente en la incubadora.

Figura 5. *Un IB en ampolla de vidrio está siendo removido de la bolsa de deshechos luego de la esterilización.*

Indicadores de lectura rápida

Debido a la importancia en la obtención de resultados con mayor rapidez, se desarrollaron indicadores biológicos de lectura rápida. Para los indicadores de esporas en tiras, el período de incubación es de 7 días hasta la obtención del resultado final “crece / no crece”. Con el desarrollo de los IB auto-contenidos el período de incubación se redujo a 48 o hasta 24 horas. Pero los usuarios requieren aún mayor rapidez para liberar sus productos o materiales que han sido esterilizados.

La tecnología usada para los IB de lectura rápida se basa en detectar la respuesta de enzimas específicas. Este tipo de IB utiliza un sistema de detección fluorimétrica, donde la enzima ligada a la espora puede ser detectada luego de la incubación y lector especial dentro de 1 a 3 horas luego del proceso de esterilización, para obtener el resultado si el ciclo pasó o falló. Para el proceso de esterilización con óxido de etileno el resultado puede obtenerse a las 4 horas. Esto ofrece una alternativa para la liberación rápida, sin esperar las 24 o más horas de incubación. Algunos usuarios de estos IB rápidos periódicamente continúan efectuando el control con IB incubados en medios tradicionales en los que el cambio de pH que resulta en cambio de color, demuestra el crecimiento o no de las esporas. Los fabricantes de los IB pueden ofrecer datos confiables sobre esta nueva tecnología.

Para uso en la industria o en clínica, también pueden obtenerse *Test packs* conteniendo integradores químicos de clase 5 e IBs de lectura a las 24 horas. Las normas AAMI permiten que las cargas de productos que no son implantes de uso clínico, o las cargas industriales puedan ser liberadas o tratadas de inmediato basándose en el resultado de integradores de Clase 5. Los paquetes además contienen un IB auto–contenido que se incuba de manera tradicional para obtener el resultado a las 24 horas. Como se ve en las Figuras 6 y 7, los Test Pack tienen un tamaño similar a los utilizados para detectar remoción de aire (Ensayo de Bowie/Dick).

Los Integradores químicos no contienen esporas, por lo cual no es aceptado como único modo de monitoreo. Pero la rapidez de obtención del resultado es muy importante en muchos casos. Este método consiste en un sólido coloreado que funde cuando el autoclave alcanza los 121 °C con presencia de vapor. La sustancia fundida avanza por el papel por capilaridad dando una indicación visual de fácil interpretación. Figura 8. Otra ventaja de estos indicadores es que se pueden guardar como registro del ciclo.

Figura 6. *Integrador químico Clase 5 de resultado inmediato. Si la esterilización es aceptable el color cambia de rosa a verde.*

Figure 7. *Envases con cartas con integradores químicos*

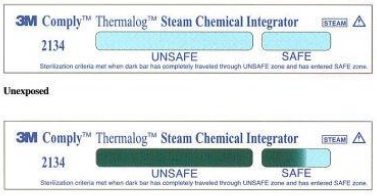


Figura 8. *Integrador químico.*

Calificación del desempeño de los Indicadores Biológicos

Con respecto al rendimiento de los IB y sus características, la mayoría de los usuarios de las industrias farmacéuticas los califican a su ingreso, estableciendo criterios de aceptación antes de usarlos para validar o monitorear algún ciclo. El criterio de aceptación por lo general sigue los lineamientos de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) para la resistencia biológica y la población microbiana. Durante el proceso de verificación para la aceptación para su uso pueden surgir dificultades respecto de cómo estos IB deben ser controlados.

Como parte de esta verificación se espera que el lote de IB que se va a ensayar cumpla con los requisitos específicos establecidos en la norma ISO o la USP en cuanto a la exactitud la resistencia o valor D, y la Población declarados por el fabricante en el certificado del lote. Por ejemplo, para que la prueba de resistencia cumpla con la USP <55> Official Monograph Biological Indicator, *Resistance Performance Tests*: "*La prueba cumple con los requerimientos si el valor D determinado está dentro del 20% del valor D informado por el fabricante a la temperatura de esterilización seleccionada, y si los límites de confianza están dentro del 10% del valor D determinado"* [(4)]. Una vez que la resistencia o el valor D se ha verificado y está dentro de los límites aceptables, y cumple o excede los criterios mínimos de aceptación para la resistencia del IB de acuerdo con la norma ISO o la USP, el lote de IB puede ser utilizado para trabajos de validación. Como ejemplo, una resistencia mínima a 121

°C para la mayoría de los ciclos de esterilización con vapor tendría un valor D de 1,5 minutos o más, y se considera un desafío aceptable para el proceso de esterilización.

Uso del *BIER Vessel*

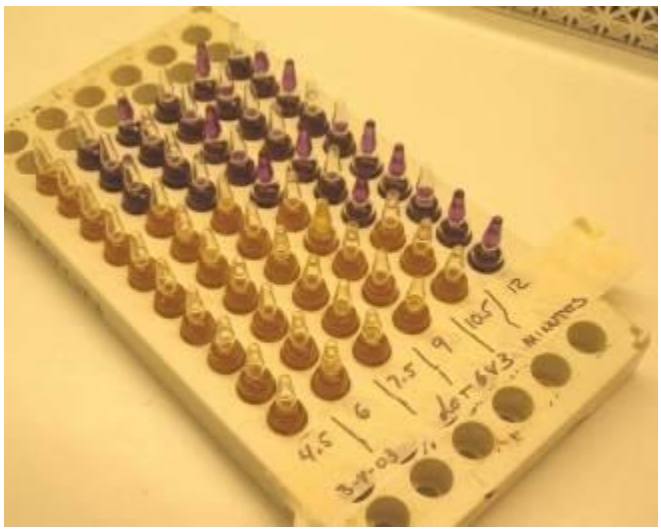
Con el fin de verificar el valor D declarado por el fabricante, la USP <55> *Resistance Performance Tests*, y la norma ISO series 11138, permiten el uso de uno de los tres siguientes métodos: Se puede utilizar el método del Número Más Probable por recuento directo, o un método de Fracción Negativa (tal como *Spearman* / *Karber*)[4], o evaluar la exactitud del valor D mediante el uso del cálculo de Tiempos de Sobrevida/Muerte según USP. Independientemente de cuál de los tres métodos se utiliza, será necesario contar con un Resistómetro. El Resistómetro, también conocido como *BIER Vessel* (*Biological Indicator-Evaluator Resistometer*), es un equipo de prueba que puede entregar muy rápidamente y con exactitud, y controlar con precisión los parámetros de esterilización que son críticos para el proceso. Varias normas desarrolladas por ANSI / AAMI, la ISO y la USP definen condiciones operacionales muy estrictas que se deben cumplir con respecto a los equipos o el BIER Vessel.

A modo de ejemplo, ANSI / AAMI ST44: 2002 establece que un equipo BIER de vapor debe ser capaz de alcanzar la temperatura seteada dentro de los 10 segundos o menos a partir de que comienza la "carga de vapor", y debe mantener la temperatura dentro del rango de más/ menos 0,5 ºC y luego, al final del ciclo, el tiempo de vacío para llegar a la presión atmosférica debe ser de 10 segundos o menos. Además ST44: 2002 establece que el Resistómetro de vapor debe ser capaz de medir condiciones tales como el tiempo (con una resolución de 00:00:01 y exactitud dentro de + / - 00:00:02), la Temperatura (con una resolución de 0.1 ºC y una exactitud de +/ - 0,5 ºC) y la presión (dentro del rango de 0 a 60 psia, con una resolución de 0,1 y exactitud de +/- 0.5 psia). El tiempo de duración de la exposición a una temperatura dada, y dicha temperatura, son entonces controlados tan exactamente como sea posible.

Se puede observar en la Figura 9, un Steam BIER Vessel fabricado por la Corporación de Steris. La cámara del equipo es bastante más pequeña que la cámara de un autoclave. La pequeña cámara es parte del diseño para permitir una carga de vapor extremadamente rápida y un rápido aumento de la temperatura. Un BIER debe ser capaz de alcanzar la temperatura seteada en menos de 10 segundos, y en muchos casos acercarse a los 6 segundos. Esto permite que el "tiempo de exposición" sea muy exacto, lo que es necesario para determinar las características de la resistencia de un IB.

Figura 9. *BIER Vessel*

Figura 10. *IB auto-contenidos en ampollas*



Si se llevara a cabo el método de la Fracción Negativa para verificar la resistencia de los IB en un BIER, hay que exponer varios grupos de IB variando el tiempo de exposición. Por ejemplo, si uno desea verificar la resistencia de un IB en particular a 121 ºC utilizando el Método de la Fracción Negativa de Spearman-Karber, se expone un grupo de 20 IB a 121 ºC durante 4.5 minutos, 6 minutos, 7.5 minutos, 9 minutos, 10.5 minutos y 12 minutos. Después de las exposiciones cada grupo de IB cuando están en tiras, se transfiere asépticamente a un medio de cultivo. Los IB se incuban a la temperatura apropiada.

En la Figura 10 se muestran ampollas con indicadores biológicos auto-contenidos que fueron utilizados para efectuar la prueba de la Fracción Negativa. El contenido de las ampollas al inicio es de color púrpura y contienen esporas bacterianas. El color es debido a un indicador de pH añadido al Caldo Tripticasa Soya (TSB). Después de la exposición y de la incubación, si las esporas en la ampolla sobrevivieron a la exposición, debido al crecimiento el líquido contenido en la ampolla vira al color amarillo. En el ejemplo de la fotografía observar que las esporas de las ampollas expuestas en un tiempo de exposición de 4.5 minutos sobrevivieron, y en el tiempo de exposición de 12 minutos, no hubo signo de crecimiento en ninguna ampolla. En el resto de los 4 tiempos de exposición se obtuvo una fracción de ampollas de color púrpura cuando las esporas han sido destruidas. Dicha fracción aumenta a medida que el tiempo de exposición es mayor. De acuerdo a la fracción obtenida en la que no hay desarrollo, o fracción negativa, y de acuerdo con el método de Spearman-Karber se puede determinar la resistencia de los IB o cuál es su resistencia en ese ciclo en particular.

Medios de Recuperación

Diferentes marcas y diferentes lotes tanto de TSB (Caldo Tripticasa Soya) como de TSA (Agar Tripticasa Soya) pueden no tener el mismo grado de capacidad para promover el crecimiento de las esporas cuando están injuriadas. Las diferentes marcas de TSA pueden actuar de manera similar para la mayoría de los ensayos típicos dentro del laboratorio, por ejemplo para aislamientos, estriados, etc, de los microorganismos más comunes utilizados. La cuantificación de las UFC de esporas injuriadas de *Geobacillus stearothermophilus* de un IB es un tema diferente. Se han publicado varios artículos que demuestran que entre marca y marca de TSA la recuperación de las esporas injuriadas difieren en términos de Log.

La Tabla 2 [5] muestra la variación en la recuperación (expresada en UFC/ IB) entre dos marcas A y B de TSA. Para efectuar el recuento de esporas viables se utilizó el método descripto en la USP capítulo <55>. Se verificó la población de 6 lotes de tiras que contenían esporas de *Geobacillus stearothermophilus*.

Table 1: The Comparitive CFU Results

Lot # of BIs Tested	Average CFUs (of triplicate plates) Recovered with TSA BRAND A	Average CFUs (of triplicate plates) Recovered with TSA BRAND B
1A	0.3×10^6	1.4×10^6
1B	0.1×10^6	1.0×10^6
2A	0.1×10^6	0.6×10^6
2B	0.1×10^6	0.7×10^6
3A	0.3×10^6	0.9×10^6
3B	0.7×10^6	1.4×10^6

Tabla 2. *Resultados comparativos de UFCs*

A partir de los dos últimos tubos en la serie de diluciones 1:10, se añadieron alícuotas de 1 ml en cada una de 6 placas de Petri; a 3 de ellas se agregó TSA de la marca A y a las otras 3, TSA de la marca B, siendo la única variable en este ensayo la marca de TSA usado. Fácilmente se puede observar la gran diferencia que existe en la capacidad de recuperación de esporas entre las dos marcas utilizadas. La determinación del valor D cuando se utiliza el método de recuento en placa será diferente si se utiliza un medio u otro.

Los utensilios de laboratorio, el Personal y la Técnica

Bajo este título se pueden agregar otras variables adicionales que harían de la evaluación del Valor D algo aún más dificultoso. Además de una reciente calibración del BIER, ¿qué pasa con los utensilios de laboratorio tales como pipetas o dosificadores? ¿Son éstos, así como las incubadoras, adecuadamente calibrados y cumplen con los criterios de aceptación? Debemos reconocer que puede haber variabilidad en la precisión entre los técnicos que realizan diluciones en serie o que realizan plaqueos. ¿Son todos los ciclos BIER revisados y cumplen especificaciones antes de su aceptación? En cuanto a la colocación de los IB en el BIER y su extracción de la cámara, deben considerarse si su ubicación es consistente entre corridas; si los IB se retiran inmediatamente después de completar el ciclo; si al inicio del ciclo se introducen rápidamente para evitar un sobrecalentamiento; y si la gradilla que contiene los IB ofrece poca o ninguna protección a los indicadores en comparación con el *rack* que utiliza el fabricante. Todos estos factores pueden sumarse y confirmar exitosamente el resultado de la prueba, que se acepta si la variación es de + / - el 20%.

Considerando todo lo anterior la verificación del valor D que debe estar dentro de la variación aceptable puede ser muy difícil de lograr. La variabilidad de la técnica de un laboratorio a otro es, sin duda un factor que contribuye al problema de la obtención de la verificación de un valor D dentro de los límites permitidos. Esta situación se ve agravada por las diferencias funcionales del equipamiento o del BIER Vessel, y por la calibración como un factor adicional.

Si se contrata una empresa para que efectúe la verificación del Valor D, pueden encontrarse algunos problemas. Incluso con todas las posibilidades mencionadas, algunas verificaciones son exitosas, dando valores dentro del rango + o - 20% permitido. Cuando esto ocurre y se repite con lotes adicionales de IB, sólo se puede suponer que ocurrió algo más que mucha suerte. Tanto el fabricante de BI como el laboratorio de ensayos están ejecutando la prueba de resistencia de una manera muy similar, y ambos están prestando una excelente atención al funcionamiento de los equipos, su calibración y mantenimiento.

Con esto en mente, cuando se trata de verificar un Valor D y surgen problemas, el Laboratorio de Verificación y el fabricante de los IB se deben comunicar para resolver dichos problemas. Los fabricantes de IB quieren que verificación dé bien y deben hacer todo lo posible para ayudar a encontrar qué aspecto de la prueba es la causante del problema. Es posible conseguir la verificación dentro del rango del 20%. Aspectos tales como las diferencias en los medios de cultivo y el método de verificación utilizados, la calibración de los equipos, etc., pueden ser la causa del problema.

En pocas palabras, elija un IB que se ajuste a sus necesidades. Documente el racional por el que eligió ese IB para aplicarlo a ese ciclo en particular. Una auditoría de la FDA puede incluir su racional para la selección del IB, y que el IB que está utilizando cumpla con los requisitos mínimos de *performance*.

Al probar la *performance*, siga todos los aspectos necesarios del procedimiento, el equipo y los medios de cultivo. Si contrata un laboratorio externo para hacer la prueba, audite sus capacidades de prueba. Asegúrese de que tengan un equipo que cumpla AAMI / USP / ISO y los procesos estén calificados. No asuma que si un laboratorio de pruebas dice que los indicadores son compatibles con la USP, entonces realmente cumplen. Solicite los protocolos de los ensayos que van a efectuar, antes de iniciar prueba y si es posible, efectúe una auditoría en el sitio.

Bibliografía:

1. *Journal of Validation Technology,* Feb. 2003
2. Photos compliments of Raven Labs, Omaha Nebraska, Division of Mesa Labs
3. Photos compliments of Raven Labs, Omaha Nebraska, Division of Mesa Labs
4. USP 36. Resistance Performance Tests- *D-Value,* <55>
5. *Infection Control Today,* January 2000
6. Holcomb, R.G., and I.J. Pflug. The Spearman-Karber Method of Analyzing Quantal Assay Microbial Destruction Data, in *Microbiology and Engineering Sterilization Processes,* ed. I.J. Pflug. St. Paul, MN: Environmental Sterilization Services, 1979.

Capítulo II.4

Control de la Validación de un Proceso de Saneamiento

José E. Martínez

Introducción

Definiciones de términos

¿Validación del Sanitizante o del Saneamiento?

El Ciclo de Vida de la Validación de Proceso Aplicado a Saneamiento

Etapa 1 - Diseño de Proceso

Etapa 2 - Calificación del Proceso

Resumen

Bibliografía

1. Introducción

Las buenas prácticas de fabricación o manufactura (en inglés *Good Manufacturing Practices, GMP*s) requieren que un edificio usado en la fabricación, el procesamiento, el embalaje (empaque), o almacenamiento de un producto medicinal sea mantenido en condiciones limpias y sanitarias [1,2,3]. También es necesario que existan procedimientos escritos para el uso de los rodenticidas, insecticidas, fungicidas, detergentes y sanitizantes. Además requieren que los equipos y los utensilios sean limpiados, mantenidos, y sanitados a los intervalos apropiados para prevenir el malfuncionamiento o la contaminación que alterarían la seguridad, la calidad, o la pureza del producto medicinal más allá de los requisitos oficiales o establecidos.

Obviamente, la conformidad con el saneamiento es primordial bajo las buenas prácticas de fabricación (BPdF). Sin embargo, pocos en las industrias farmacéuticas y de biotecnología saben cómo los sanitizantes (y los desinfectantes) actúan, y las medidas a tomar para preservar su eficacia. Esta falta de comprensión lleva una carga grande porque ambas industrias gastan mucho tiempo y dinero intentando mantener bajo control las cualidades microbiológicas de sus equipos y ambientes de fabricación, y en última instancia de sus productos.

Muchas personas utilizan expresiones inexactas cuando se refieren a desinfectantes. Por ejemplo, es común confundir los desinfectantes con los sanitizantes. Aunque estos agentes sean similares, pueden no ser los mismos. La desinfección apunta a destruir todos los microorganismos (patógenos y no patógenos) y el saneamiento a la reducción de esos microorganismos a niveles no peligrosos). También es común confundir antisépticos con desinfectantes. Los antisépticos son agentes microbicidas bastante inofensivos que pueden ser aplicados superficies vivas como son la piel y las membranas mucosas (por ejemplo, solución de yodo, alcoholes, 3% peróxido de hidrógeno).

En general, los desinfectantes son agentes químicos que destruyen los microorganismos, pero no necesariamente sus esporas, no son seguros para el uso a los tejidos vivos y se utilizan en objetos inanimados tales como superficies, pisos, utensilios, etc. Ejemplos de desinfectantes son: hipoclorito de sodio, compuestos de cloro, fenoles, compuestos cuaternarios de amonio, y peróxido de hidrógeno (≥ 3% v/v).

Normalmente, los desinfectantes y los antisépticos son distinguidos en base a si son seguros para el uso en superficies animadas. A menudo, la seguridad depende de la concentración del compuesto. Por ejemplo, el hipoclorito de sodio (cloro), según lo añadido al agua es seguro para beber, pero el hipoclorito de sodio al 5%, es un desinfectante excelente, pero no es seguro para beber.

Las industrias farmacéuticas y de biotecnología limpian los equipos con un detergente y utilizan generalmente un agente antimicrobiano para reducir o para eliminar la contaminación microbiana. Estas industrias llaman generalmente al proceso de reducir la contaminación microbiana "desinfección," aunque el término correcto es "saneamiento" o "sanitización" o "sanitación". Aquí tenemos tres sinónimos. En inglés también existen varios sinónimos: *sanitization* o *sanitation* o *sanitisation*.

Debido a que las superficies son inanimadas, deben correctamente ser llamadas contaminadas, en lugar de infectadas. Más aún, las superficies deben estar previamente contaminadas con microorganismos patógenos antes de proceder a desinfectarlas. Es importante conocer que la probabilidad de encontrar un patógeno verdadero en un ambiente que cumpla con las BPdF es muy baja. Así, la desinfección, según lo definido correctamente, no es necesaria. Por lo tanto, debemos referirnos al saneamiento y no a la desinfección. Además no puede conocerse cuándo un microorganismo saprófito puede transformarse en patógeno ya que dependerá de las defensas de una persona. Por otra parte, existen los microorganismos objetables que son por el momento responsabilidad del elaborador.

El saneamiento es un proceso de naturaleza similar a la limpieza y por ende debe ser seguro y efectivo bajo condiciones normales de uso. Esto conlleva una validación del proceso de saneamiento según se estipula bajo las normativas internacionales y nacionales. Una vez que se completa la validación es preciso asegurar que el proceso no sufra cambios intencionales o inadvertidos que afecten la seguridad y eficacia del saneamiento. Consecuentemente tenemos que el control de la eficacia de los sanitizantes y desinfectantes se asegura por medio del ciclo de vida de la validación de procesos según las prácticas reconocidas en las industrias farmacéuticas y de biotecnología.

2. Definiciones de Términos

A continuación se presentan definiciones de términos, según lo publicado por Gilbert y McBain y la Universidad de Colorado – Bouder de los EUA.[4,5]

Antiséptico: Una formulación que contiene agentes germicidas, microbicidas, o bactericidas que son seguros para el uso en organismos vivientes.[4]

Concentración Bactericida Mínima (MBC): La concentración de producto biocida que mata o desactiva a más del 99,9% de microorganismos en una prueba in vitro.[4]

Concentración Inhibitoria Mínima (MIC): La concentración más baja de un agente antibacteriano que inhibe el crecimiento visible (es decir, colonias en una placa o la turbiedad en un cultivo de caldo) bajo condiciones de prueba estándar.[4]

Desinfectante: Un germicida que inactiva virtualmente todos los microorganismos patógenos conocidos, pero no necesariamente todos los microbios [5]. Porque estas superficies están inanimadas, se consideran contaminadas, no infectadas.

Desinfección: Un procedimiento que elimina a muchos o a todos los microorganismos patógenos con la excepción de las esporas. [5]. Los organismos ambientales que no son patógenos pueden no ser eliminados totalmente con la desinfección.

Esporicida: Una sustancia usada para matar a las esporas de bacterias y hongos.[4]

Resistencia: La insensibilidad relativa de un microorganismo a un tratamiento particular bajo sistema de condiciones especificadas. Para los agentes antibacterianos, la resistencia se cuantifica generalmente como la concentración mínima requerida teniendo un efecto definible (es decir, inhibición del crecimiento) sobre una población de células.[4].

Saneamiento (Sanitización): El proceso de reducir la contaminación microbiana a un nivel aceptable que sea seguro.[5].

Sanitizante: Una sustancia química o un agente físico que reduce los niveles de contaminación de microorganismos en superficies ambientales inanimadas.

3. ¿Validación del Sanitizante o del Saneamiento?

Aunque los reguladores nunca han definido formalmente la "validación de desinfectantes (sanitizantes)", las agencias reguladoras citan con frecuencia fracasos en asegurar la desinfección (saneamiento) apropiada.

Aunque hablemos comúnmente de la "validación de desinfectantes", la agencia federal para la *FDA* de los EUA establece que los procesos tienen que ser validados [6]. El desinfectante no se puede validar porque no es un proceso; entonces bajo este argumento los desinfectantes se califican (cualifican), es decir, se demuestra que son eficaces en el contexto de un proceso dado. Por ejemplo, se califica la fuente de vapor de agua para un autoclave y después se valida el proceso de la esterilización. El acercamiento a la desinfección debe ser similar, de modo que una definición de trabajo para la validación de un proceso de desinfección "estableciera pruebas documentadas de que el proceso de desinfección consistentemente desactivará o matará posibles o conocidos patógenos de objetos inanimados."

El párrafo anterior también aplica idénticamente a los sanitizantes. Los sanitizantes no se validan, se califican. Pero tal como explico en la introducción de este documento el proceso que se utiliza en las industrias farmacéuticas y de biotecnología es el de saneamiento. Por lo tanto el proceso de saneamiento es el que se valida.

Para propósitos de este documento podemos establecer que la definición de la validación del proceso de saneamiento es como sigue: "establecer pruebas documentadas que demuestren que el proceso de saneamiento reducirá consistentemente las poblaciones de microorganismos en superficies inanimadas a los niveles preestablecidos que se consideren seguros". Los niveles microbianos pre-establecidos se deben basar en códigos de salud pública, regulaciones (normativas), pautas de la industria, o un análisis científico razonado.

Es menester informar que a partir de este momento se debe entender que el vocabulario referente a saneamiento mencionado también aplicará a la desinfección y viceversa.

4. El Ciclo de Vida de la Validación de Proceso Aplicado a Saneamiento

El ciclo de vida de la validación es un mecanismo de implantación que define la organización y la ejecución de las actividades de una validación. Una considerable colección de referencias existe que identifica cómo validar procesos de diversos tipos y descripciones por lo que en este documento no pretende entrar en los detalles de los procesos de validaciones. La intención es proporcionar una guía de como el ciclo de vida de la validación es importante para el control de la eficacia de sanitizantes y desinfectantes.

La validación del proceso implica una serie de actividades que ocurren durante el ciclo vital del producto y del proceso. Estas actividades están discutidas a cabalidad en documentos ANSI/AAMI/ISO y en otras publicaciones[6,14]. Como el saneamiento no es un proceso que requiere los mismos detalles que la fabricación de un producto farmacéutico o un dispositivo médico, el ciclo de vida no es complicado. Por esta razón el modelo de ciclo de vida a utilizarse es el presentado en la guía de la *FDA* de EUA para la validación de procesos. El título de esta guía es *Process Validation: General Principles and Practices*, en español se traduce como "Validación de Proceso: Principios y Prácticas Generales". Este documento fue publicado en enero de 2011 [6] (de ahora en adelante la *guía-FDA*.).

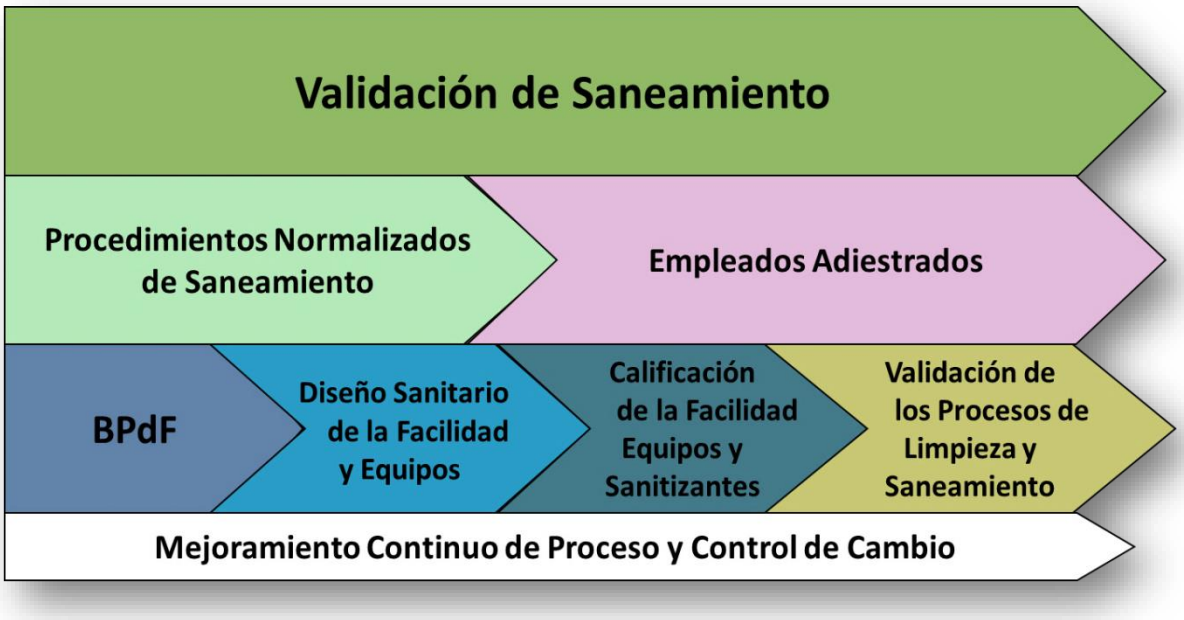
La guía-FDA describe las actividades para la validación de un proceso en tres etapas:

- Etapa 1 - *Diseño de proceso*: En esta etapa el proceso se define basado en el conocimiento ganado con las actividades de investigación y desarrollo.
- Etapa 2 - *Calificación de proceso*: Durante esta etapa, el diseño de proceso se evalúa para determinar si el proceso es capaz de una ejecución reproducible y eficaz.
- Etapa 3 - *Verificación continua de proceso*: La garantía continua se obtiene durante la ejecución rutinaria que demuestra que el proceso se encuentra en un estado de control.

La Figura 1 presenta un esquema del ciclo de vida de la validación.

En adición, basado en la guía-FDA, se puede establecer que un programa apropiado de la validación dependerá de la información y del conocimiento del sanitizante y del desarrollo de proceso de saneamiento. Y que este conocimiento y la comprensión del proceso son la base para establecer el enfoque para el control del proceso de saneamiento que da lugar a superficies con las cualidades microbiológicas deseadas.

Figura 1: *Esquema de la Validación de Saneamiento*



Las personas a cargo deben:

- Entender las fuentes de variación
- Detectar la presencia y el grado de variación
- Entender el impacto de la variación en el saneamiento y su efecto en la carga microbiana en las superficies.
- Controlar la variación de una forma proporcional con el riesgo que representa al saneamiento y a la carga microbiana en las superficies.

4.1 Etapa 1 - Diseño de Proceso

La meta de esta etapa es diseñar un proceso conveniente para el saneamiento rutinario que pueda cumplir con los atributos microbiológicos especificados para las superficies.

El saneamiento comienza con una limpieza apropiada. Los residuos como grasas, aceites y proteínas pueden evitar que el sanitizante entre en contacto físico con la superficie que necesita ser sanitizada. Además, la presencia de residuos orgánicos puede inactivar o reducir la efectividad de algunos tipos de sanitizantes (ej. hipocloritos) volviendo el proceso ineficaz. Una limpieza eficaz debe ser demostrada mediante la validación del proceso de limpieza.

La validación de limpieza contiene una serie de pre-requisitos mínimos que son también necesarios para la validación del saneamiento.

- Todos los equipos y utensilios deberán estar diseñados de tal forma y construidos con un material que permita la limpieza y el mantenimiento necesario.
- El diseño, construcción y uso de los equipos y utensilios deberá prevenir la contaminación con lubricantes, combustible, fragmentos metálicos, agua inapta para el consumo o cualquier otra fuente de contaminación.
- Las superficies de contacto deben ser resistentes a la corrosión, construidos de materiales no tóxicos, y diseñadas para resistir el uso previsto para éstas, más la acción de los detergentes y sanitizantes.

Una validación de limpieza debe contener los siguientes elementos:

- Clase de detergente y concentración
- Temperatura del agua
- Dureza del agua
- pH del agua
- Período de contacto
- Método de aplicación del detergente (limpieza en sitio, aspersión, manual, etc.)
- Método de secado de las superficies después de la limpieza.

Aunque no lo parezca, el procedimiento de limpieza es hostil a los microorganismos por las siguientes razones:

- la temperatura del agua suele ser > 60 ºC
- el pH de los detergentes suele estar en los extremos de acidez y alcalinidad
- los detergentes contienen surfactantes que ayudan en la remoción de los microorganismos de las superficies.

Por lo tanto, es común que la carga microbiana se reduzca en > 90% con la limpieza.

Basado en el párrafo anterior es importante conocer la carga microbiana antes y después de la limpieza. Si la carga microbiana después de la limpieza cumple con los parámetros especificados es posible que el proceso de saneamiento no sea necesario. Pero hay que tener cuidado en cómo se establece la especificación para la carga microbiana después de la limpieza. Conviene no especificar en el procedimiento de limpieza o en el protocolo, que se va a reducir la carga microbiana a un nivel preestablecido porque si la carga microbiana excede el limite antes de la limpieza entonces el último producto procesado en el equipo podría considerarse contaminado. Conviene entonces especificar que el procedimiento de limpieza va a reducir la carga microbiana en > 90%, en 1-log, etc.

Una vez que el proceso de limpieza es desplegado se procede a desarrollar el proceso de saneamiento. Para el proceso de saneamiento es importante considerar la carga microbiana de la superficie a sanitizar. Si las bacterias se encuentran en un estado vegetativo son fáciles de eliminar, pero no así si se encuentran como esporas, ya que estas últimas son altamente resistentes. También cuando se está desarrollando un procedimiento de saneamiento es necesario tener en consideración el impacto ambiental y el costo vs. efectividad del sanitizante.

Un sanitizante se elige básicamente a base de los siguientes parámetros:

- Tipo y número de microbios presentes sobre la superficie después de la limpieza
- El espectro de la actividad deseada (por ejemplo bacterias vegetativas vs. esporas)
- Tipo de superficie que se sanitizará y su compatibilidad con el sanitizante
- La posible necesidad de mantener una actividad microbicida residual sobre la superficie
- Potencial para la corrosión o el deterioro de la superficie
- Posibles efectos del sanitizante al producto fabricado
- La posible rotación de sanitizantes (por ejemplo bactericida y esporicida)
- Seguridad de los empleados.

Una validación de saneamiento contiene los mismos elementos que la validación de limpieza, excepto que se reemplaza al detergente por el sanitizante.

Calificación del Sanitizante mediante pruebas

Para la validación del proceso de saneamiento es de importancia extrema también calificar el sanitizante. Pero la pregunta es: ¿Cómo se califica un sanitizante? Un sanitizante debe ser calificado a base de la

demostración de su eficacia como bactericida, fungicida, esporicida o de amplio espectro, según su uso predeterminado.

Existen numerosos estándares de cómo demostrar la eficacia de desinfectantes y antisépticos, pero estos no mencionan la palabra sanitizante. En realidad esto no debe ser motivo de preocupación debido a que un agente antimicrobiano puede ser clasificado como desinfectante o sanitizante dependiendo de la intención con la cual será utilizado. Si es usado para matar posibles microorganismos patógenos o verdaderos patógenos entonces es un desinfectante. Ahora si es utilizado para reducir la carga microbiana de una superficie entonces es un sanitizante. Si un agente antimicrobiano ha demostrado su eficacia como desinfectante, entonces se puede deducir lógicamente que también será eficaz como sanitizante.

Las pruebas de desinfectantes tienen sus orígenes en la década de 1880 junto a los orígenes de la microbiología cuando Robert Koch inoculó las esporas de ántrax sobre hilos de seda, luego sumergía los hilos en desinfectantes y cultivaba los hilos en medios de cultivos o los inoculaba en animales de laboratorio.

Una de las primeras evaluaciones estandarizadas para la actividad de los desinfectantes fue la prueba de Rideal- Walker [15], que comparaba al desinfectante bajo prueba con un desinfectante estándar (fenol), el resultado, era expresado como coeficiente de actividad, mejor conocido como "coeficiente de fenol". Esta prueba fue modificada para incluir materia orgánica en la prueba de Chick-Martin, otra prueba de coeficiente de fenol. Sin embargo, el concepto de comparar un desinfectante con un compuesto arbitrario de referencia generaba información limitada sobre los atributos de un desinfectante y de cómo utilizarlo. Otra deficiencia en las pruebas de coeficiente de fenol era un aumento evidente de la actividad microbicida causado por el remanente de desinfectante en la fase de la recuperación. A pesar de las deficiencias presentadas por las pruebas de coeficiente de fenol, éstas continuaron en uso hasta la década de 1960.

La prueba de Kelsey-Sykes, primero publicada en el 1969 en el Reino Unido, con una versión mejorada en 1974, modeló la dilución progresiva y la contaminación que un desinfectante puede encontrar durante el uso y también incluyó la neutralización del desinfectante durante el muestreo [16]. El resultado obtenido por esta prueba era en una concentración de desinfectante apropiada para el uso en condiciones limpias o sucias en lugar de una comparación arbitraria como lo era el "coeficiente de fenol". Luego se desarrollaron una multiplicidad de pruebas de desinfectantes químicos por los diversos organismos de estandarización nacionales tanto en América como en Europa. Afortunadamente esta multiplicidad de pruebas está siendo substituida por estándares internacionales.

El capítulo 1072 (*USP 1072*), Desinfectantes y Antisépticos (en inglés: *Disinfectants and Antiseptics*), de la farmacopea de EUA (*USP - USA*) provee una guía básica sobre desinfectantes.[17] Este capítulo, que es informativo y no normativo, discute la selección de desinfectantes y de antisépticos químicos; la demostración de su eficacia bactericida, fungicida y esporicida; el uso de desinfectantes en el área de fabricación farmacéutica aséptica y no-aséptica y consideraciones normativas y de la seguridad. No se incluye información específica sobre la validación del proceso de desinfección o saneamiento.

Se instruye en *USP 1072* que la eficacia antimicrobiana se obtiene mediante las pruebas de la eficacia de desinfectantes (en inglés *Disinfectant Effectiveness Tests* o *DETs*). Las pruebas del *AOAC* incluyen la prueba de portador (*carrier test*) y la prueba de dilución-uso para la actividad bactericida. Igualmente se incluyen pruebas para micobactericidas y esporicidas. El *USP 1072* se limita a indicar que en los EUA los métodos de pruebas para desinfectantes oficiales son publicados por la AOAC Internacional (*AOAC International*).[18] *AOAC* es un acrónimo para la *Association of Official Analytical Chemists*.

Los EUA y la Unión Europea (UE) requieren a las compañías que registran productos antimicrobianos tales como desinfectantes, sanitizantes, esporicidas, y agentes esterilizantes, que tienen que asegurar la seguridad y la eficacia de sus productos antes de que se vendan o se distribuyan. Las compañías que registran estos productos deben abordar la composición química de su producto, incluyendo datos toxicológicos para documentar que su producto es seguro si es utilizado según lo escrito en la etiqueta. Sobre todo deben incluir los datos de la eficacia para documentar sus demandas de la actividad microbiana contra organismos específicos y para apoyar las direcciones de uso establecidas en la etiqueta.

Las pruebas del *AOAC* no son los únicos medios de recopilar datos de efectividad antimicrobiana a nivel internacional. En la mayor parte de Europa los estándares reconocidos de *DETs* vienen del enfoque sistemático del Comité Técnico del Programa de Trabajo conocido como "CEN 216 – Desinfectantes y Antisépticos Químicos" (*Technical Committee for TC 216 Work Program, "Chemical Disinfectants and*

Antiseptics) ([19]) bajo el Comité Europeo para la Normalización (*European Committee for Normalization* o *CEN*). El CEN utiliza los métodos de la *Association Française de Normalisation* (AFNOR), entre otros, para el estudio de la efectividad antimicrobiana.

La metodología desarrollada por CEN 216 tiene tres fases a saber:

- Fase 1: Pruebas de suspensión cuantitativa bajo condiciones limpias para la actividad básica del desinfectante.
- Fase 2, Paso 1: Prueba de suspensión cuantitativa bajo las condiciones representativas de uso.
- Fase 2, Paso 2: Prueba de superficie cuantitativa bajo las condiciones representativas de uso.
- Fase 3: Pruebas de campo bajo las condiciones actuales de uso.

La Tabla 1 presenta una descripción más detallada de la metodología CEN 216, mientras la Tabla 2 lista los estándares publicados por CEN 216 con aplicación industrial.

Tabla 1: *Metodología CEN 216 para las pruebas de la eficacia de desinfectantes*

Fase	Tipo de Prueba	Propósito
Fase 1	Prueba de suspensión cuantitativa bajo condiciones limpias para la actividad básica del desinfectante.	Para establecer que un producto tiene actividad bactericida y/o fungicida sin consideración alguna hacia las condiciones específicas del uso previsto. Si el producto pasa, califica para las pruebas adicionales.
Fase 2 Paso 1	Prueba de suspensión cuantitativa bajo las condiciones representativas de uso.	Para establecer que un producto tiene actividad bactericida y/o fungicida, y/o esporicida y/o antivírica, y/o tuberculicida, etc., bajo condiciones apropiadas a su uso destinado bajo pruebas en condiciones de laboratorio. Si el producto pasa, califica para reclamos genéricos de desinfectancia.
Fase 2 Paso 2	Prueba de superficie cuantitativa bajo las condiciones representativas de uso.	Pruebas adicionales de laboratorio como las pruebas del lavado de manos y la frotación de manos, y las pruebas en superficies inertes para establecer que los productos tienen actividad microbicida contra los microorganismos pegados a una superficie. Si el producto pasa, califica para reclamos de desinfectancia en superficies.
Fase 3	Pruebas de campo bajo las condiciones actuales de uso.	Pruebas confirmatorias que confirman los resultados de las fases 1 y 2.

Las pruebas de la eficacia de desinfectantes no son pruebas rutinarias en los laboratorios de las industrias farmacéuticas y de biotecnología, por lo que la mayoría de los microbiólogos en estas industrias no están familiarizados con ellas. Los protocolos de ejecución toman mucho tiempo para aprender y un tiempo extenso para ejecutarse, lo que los hace costosos. Además, son difíciles de ejecutar y se hacen infrecuentemente, lo que previene mantener personal de laboratorio diestro para originar resultados reproducibles.

La reproductibilidad es crítica para la interpretación apropiada de resultados producidos por *DETs*. La variabilidad en las pruebas del AOAC es causada sobre todo por errores en la preparación de las soluciones y en los medios de cultivos empleados en las pruebas. Algunos estudios han mostrado, sin embargo, que la técnica en las pruebas del *AOAC* ([20,21]) y la preparación del inóculo ([22]) pueden también introducir mucha variación. Las variaciones en condiciones durante la conservación en cámara frigorífica (por ejemplo, refrigeración, congelación, liofilización) pueden afectar al genotipo predominante en la cepa de cultivo o en la cepa madre ([23]). Así, cuando las compañías intentan calificar los desinfectantes (sanitizantes) usando los protocolos del *AOAC*, pueden no poder reproducir las afirmaciones microbicidas en la etiqueta de los fabricantes de desinfectantes. Las pruebas del CEN 216 padecen también de los problemas de reproducibilidad causados por la variación en la preparación del inóculo y la cantidad del inóculo ([24, 25]).

Tabla 2: *Estándares Publicados por CEN 216*

Normativa	Título
EN 1040:2005	Desinfectantes y antisépticos químicos– prueba de suspensión cuantitativa para evaluación de actividad bactericida básica de desinfectantes y de antisépticos químicos- Método de prueba y requisitos (fase 1).
EN 12353:2013	Desinfectantes y antisépticos químicos- Conservación de microorganismos de prueba utilizados para la determinación de la actividad bactericida, micobactericida, esporicida y fungicida.
EN 1275:2005	Desinfectantes y antisépticos químicos-prueba de suspensión cuantitativa para evaluación de actividad básica fungicida o levaduricida- Método de prueba y requisitos (fase1).
EN 1276:2009	Desinfectantes y antisépticos químicos- prueba de suspensión cuantitativa para evaluación de actividad bactericida de desinfectantes y antisépticos químicos utilizados en alimentos, industrias, áreas domésticas y áreas institucionales- Método de prueba y requisitos (fase 2, paso 1).
EN1276:2009/ AC:2010	Desinfectantes y antisépticos químicos- prueba de suspensión cuantitativa para evaluación de actividad bactericida de desinfectantes y antisépticos químicos utilizados en alimentos, industrias, áreas domésticas y áreas institucionales- Método de prueba y requisitos (fase 2, paso 1).
EN 13610:2002	Desinfectantes químicos- prueba de suspensión cuantitativa para la evaluación de actividad antivírica contra bacteriófagos de desinfectantes químicos utilizados en alimentos y áreas industriales- Método de prueba y requisitos (fase 2, paso 1).
EN 13697:2015	Desinfectantes y antisépticos químicos- prueba de suspensión cuantitativa para superficies no porosas para evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de desinfectantes químicos utilizados en alimentos, industrias, áreas domésticas y áreas institucionales- Método de prueba y requisitos (fase 2/ paso 2).
EN 13704:2002	Desinfectantes químicos- prueba de suspensión cuantitativa para la evaluación de la actividad esporicida de desinfectantes químicos utilizados en alimentos y áreas industriales - Método de prueba y requisitos (fase 2, paso 1).
EN 14885:2015	Desinfectantes y antisépticos químicos- La aplicación de los estándares europeos para desinfectantes y antisépticos químicos.
EN 1499:2013	Desinfectantes y antisépticos químicos- Lavado higiénico de manos- Método de prueba y requisitos (fase 2, paso 2).
EN 1500:2013	Desinfectantes y antisépticos químicos- Frotación higiénica de manos- Método de prueba y requisitos (fase 2, paso 2).
EN 1650: 2008+A1:2013	Desinfectantes y antisépticos químicos- Prueba de suspensión cuantitativa para evaluación de la actividad fungicida y levaduricida de desinfectantes y antisépticos químicos utilizados en alimentos, industrias, áreas domésticas y áreas institucionales - Método de prueba y requisitos (fase 2, paso 1).

4.2 Etapa 2 - Calificación del Proceso

Durante la etapa de la calificación del proceso (en inglés *Process Qualification* o *PQ*) de la validación del proceso, el diseño del proceso se evalúa para determinar si el proceso es reproducible. Esta etapa tiene dos elementos: diseño / calificación del equipo y de las utilidades (servicios), y la calificación del funcionamiento del proceso (en inglés *Process Performance Qualification* o *PPQ*). Aquí, el término calificación se refiere a las actividades emprendidas para demostrar que las utilidades y el equipo son convenientes para su uso previsto y que su desempeño es correcto. Estas actividades preceden los procesos de validación de la limpieza y del saneamiento.

4.2.1 Calificación de las Utilidades y el Equipo

La calificación de las utilidades (servicios) y del equipo incluye generalmente las actividades siguientes:

- Selección de los materiales de construcción de las utilidades (servicios) y del equipo, fundamentos de funcionamiento, y características de desempeño a base de si son apropiadas para sus aplicaciones específicas.

- Confirmación de que los sistemas y el equipo estén construidos e instalados de acuerdo con las especificaciones del diseño.
- Confirmación de que los sistemas y el equipo operan de acuerdo con los requisitos de proceso en todos los alcances de operación anticipados.

4.2.2 Calificación del Desempeño del Proceso (PPQ)

El *PPQ* combina las utilidades y el equipo (calificados previo a esta fase), las personas adiestradas en los procesos de limpieza y de saneamiento, los procedimientos normalizados de operación, y los materiales requeridos. Un *PPQ* exitoso confirmará el diseño del proceso y demostrará que el proceso de saneamiento se desempeña como fue diseñado.

Desafortunadamente las pruebas para la eficacia de los desinfectantes no reflejan condiciones de uso. El inóculo de microorganismos usado en la prueba de *DETs* no imita el comportamiento del crecimiento ambiental microbiano (por ejemplo, biopelículas y microorganismos adheridos a superficies). Además, los *DETs* fallan en considerar los efectos de la etapa precedente de limpieza. Por lo tanto, las condiciones de prueba usadas por los fabricantes de los desinfectantes y los sanitizantes tienen poca relación a los procesos de saneamiento usados en las industrias farmacéuticas y de biotecnología. Los fabricantes de desinfectantes confían en la prueba de portador (*carrier test*) y la prueba de dilución-uso para proporcionar los datos para el registro en los EUA y en Europa para las concentraciones recomendadas de uso.

La validación de un proceso de saneamiento se debe basar en pruebas empíricas (de campo) para la eficacia de sanitizantes (desinfectantes) en condiciones actuales de uso, sugiriendo la relación lógica:

pruebas exitosas de campo bajo condiciones de uso = validación.

Para los desinfectantes y sanitizantes registrado en los EUA o en la UE no habría necesidad de realizar pruebas de DETs en los laboratorios que dan servicios a las compañías. Los DETs realizados por los fabricantes para el registro deben ser suficientes para asegurar la acción biocida del sanitizante y para su selección inicial. Existe experiencia abundante que demuestra que los desinfectantes y los sanitizantes son más eficaces en uso real que indicado por DETs. Además, las altas concentraciones de microorganismos en los inóculos usados en los estudios de laboratorio representan una "peor situación" (*worst-case*) a la que se puede enfrentarse un sanitizante para uso en las industrias farmacéuticas y de biotecnología. Debemos, por lo tanto, poder contar en una segunda relación lógica:

registro = calificación.

Este enfoque haría los *DETs* realizados en las compañías farmacéuticas y de biotecnología innecesarios, y simplificaría grandemente el proceso de la validación del saneamiento quitando del medio a el paso más difícil; la ejecución de *DETs*. Solamente los desinfectantes o sanitizantes que no se han registrado para el propósito previsto requerirían entonces la calificación adicional con DETs.

Las pruebas de superficies todavía serían requeridas para desarrollar los procedimientos de los procesos de saneamiento. Estas pruebas evaluarían la eficacia del sanitizante (desinfectante) seleccionado contra microorganismos adheridos a superficies. En estos análisis los microorganismos se secan sobre las superficies de cupones, luego son expuestos a un sanitizante, y después son aislados para enumerarlos por técnicas convencionales o por métodos microbiológicos rápidos. Las pruebas superficiales convencionales son fáciles de ejecutar y son baratas. También se pueden realizar por la mayoría de los laboratorios de microbiología. Las pruebas de superficie pueden reflejar condiciones normalmente utilizadas como los tiempos de contacto, la temperatura de uso, las diluciones de uso, y las propiedades de las superficies. Estas pruebas se pueden modificar para realizarse después de una limpieza representativa por lo que imitarían mejor las condiciones actuales de uso. El proceso propuesto de saneamiento sería desarrollado en base de las pruebas de superficie. Finalmente, el proceso propuesto de saneamiento sería validado mediante los desafíos impuestos en pruebas de campo en condiciones de uso reales.

La validación del proceso de saneamiento entonces sería realizada mediante una metodología simple:

- limpieza del equipo
- saneamiento del equipo
- toma de muestras para carga microbiana.

También es necesario evaluar el tiempo que transcurre entre la limpieza y sanitización del equipo y el uso de este. El tiempo máximo de almacenamiento del equipo limpio y sanitizado tiene que ser validado empíricamente.

5. Resumen

La validación de los sanitizantes y desinfectantes, según la jerga común, parece ser una tarea complicada, pero en realidad no lo es. Estos agentes químicos no se validan; se califican para el propósito previsto, y entonces el proceso de saneamiento es el que se valida. La parte más difícil de la validación del proceso del saneamiento sería la ejecución de las pruebas *DETs* por el usuario. Las pruebas de *DETs* son superfluas cuando el sanitizante (desinfectante) seleccionado ha sido registrado adecuadamente. La metodología de la validación del proceso de saneamiento tiene que incluir la limpieza como parte del proceso de saneamiento, de este modo la validación del proceso de saneamiento se convierte en la ejecución acertada de pruebas de campo bajo condiciones reales de uso. Esta metodología es rentable, simple y ahorra tiempo.

Después de la validación, el mantenimiento de la eficacia de sanitizantes y desinfectantes se rige por medio del control de cambios del ciclo de validación. El control de cambios aseguraría que los cambios en los siguientes elementos no afectarían el proceso validado:

- facilidades
- equipo
- procedimientos normalizados de limpieza y saneamiento.

En su expresión holística el control de la eficacia de sanitizantes (desinfectantes) se logra mediante la aplicación estricta de un programa de limpieza y saneamiento que incluya procedimientos de evaluación periódica.

6. Bibliografía:

1. Disposición 2819/2004 ANMAT; "*Apruébanse los lineamientos generales de Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores/Exportadores de Medicamentos"*.
2. NORMA Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de fármacos.
3. *Title 21- Food and Drugs; Part 211- Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=211 accessed March 26, 2018*.
4. P. Gilbert and A.J. McBain, *"Potential Impact of Increased Use of Biocides in Consumer Products on Prevalence of Antibiotic Resistance,"* Clin. Microbiol. Rev. 16 (2), 189-208, 2003.
5. Disinfectants and Sterilization Methods; University of Colorado Boulder, *https://ehs.colorado.edu/resources/disinfectants-and-sterilization-methods/, accessed March 26, 2018.*
6. *Food and Drug Administration, EUA, "Process Validation: General Principles and Practices", Rev. A. January 2011*.
7. *ANSI/AAMI/ISO 11135:2014, Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical device.*
8. *ANSI/AAMI/ISO 11607-2:2006/(R) 2010, Packaging for terminally sterilized medical devices - Part 2: Validation requirements for forming, sealing and assembly processes*.

9. *ANSI/AAMI/ISO 14937:2009, Sterilization of health care products - General requirements for characterization of a sterilizing agent and the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices.*
10. *ANSI/AAMI/ISO 20857:2010, Sterilization of health care products - Dry heat: Requirements for the development, validation and routine control of an industrial sterilization process for medical devices, 1ed.*.
11. *AAMI TIR36:2007, Validation of software for regulated processes.*
12. *ICH Q10, Pharmaceutical Quality System. April 2009.*
13. *FDA/Global Harmonization Task Force (GHTF; medical devices), Quality Management Systems – Process Validation, edition 2, guidance, January 2004.*
14. *FDA/ICH Q7, Good Manufacturing Practice for Active Pharmaceutical Ingredients, guidance for industry, August 2001.*
15. S. Rideal, J.T.A. Walker. *Standardization of disinfectants. Journal of the Sanitary Institute, London 24, 424-441, 1903.*
16. J.C. Kelsey, I.M. Maurer. *An improved Kelsey-Sykes test for disinfectants. The Pharmaceutical Journal, 207, 528-530, 1974.*
17. *USP <1072> Disinfectants and Antiseptics. United States Pharmacopeia (USP 41–NF 36), 2017.*
18. *AOAC International Official Methods of Analysis, 20th edition, 2016. Arlington, VA.*
19. *Chemical Disinfectants and Antiseptics: CEN/TC 216*. https://standards.cen.eu/
20. E.C. Cole, W.A. Rutala, G.P. Samsa. *"Disinfectant Testing Using A Modified Use-Dilution Method: Collaborative Study," J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71 (6), 1187–1194, 1988.*
21. E.C. Cole, W.A. Rutala. *"Bacterial Numbers on Penicylinders Used in Disinfectant Testing: Use of 24 Hour Adjusted Broth Cultures," J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71 (1), 9–11, 1988.*
22. E.C. Cole, W.A. Rutala, J.L. Carson. *"Evaluation of Penicylinders Used in Disinfectant Testing: Bacterial Attachment and Surface Texture," J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70 (5), 903–906, 1987.*
23. S.F. Bloomfield et al., *"Development of Reproducible Test Inocula for Disinfectant Testing," Int. Biodeterioration & Biodegradation 36 (3–4), 311–331, 1995.*
24. M.D. Johnston, E.A. Simons, R.J.W. Lambert. "*One Explanation for the Variability of the Bacterial Suspension Test*," J. Appl. Microbiology 88 (2), 237–250, 2000.
25. S.B.I. Luppens, F.M. Rombouts, T. Abee. *"Disinfectants in a Suspension Test," J. Food Prot. 65 (1), 124–129 (2002).*

Capítulo II.5.

Conservadores en productos farmacéuticos y cosméticos

Miguel D'Aquino y Sergio A. Teves

Introducción

Efectividad de los conservadores de acuerdo con diferentes metodologías

Procedimientos:

- *CTFA, ASTM, USP, BP, UE*
- *Otros procedimientos*
- *Ensayos de capacidad*

Empleo de antagonistas o neutralizadores

Bibliografía

Introducción

Los conservadores son sustancias individuales o mezclas que se encuentran en productos cosméticos y algunos productos farmacéuticos a fin de que se mantengan preservados de una contaminación microbiana durante su uso y/o almacenamiento, y evitar de esta forma una alteración del producto (física, química u organoléptica) o un daño de tipo patogénico sobre el usuario (daño sanitario), ambas situaciones son causa de reclamos por parte del usuario con el consiguiente daño económico.

Si un preparado Farmacéutico / cosmético no posee por sí, una adecuada actividad antimicrobiana, debe añadírsele un protector que es un agente químico conservador, en especial a los preparados acuosos.

Los fármacos o cosméticos pueden contaminarse durante su producción a través de materias primas, u operaciones no adecuadas; o durante su uso (especialmente en envases multidosis), sobre todo si el producto permite el desarrollo microbiano, lo que se traduciría como ya se ha dicho, en alteraciones de tipo sanitario (infecciones, intoxicaciones, etc.) o de tipo económico (deterioro en general). La calidad debe mantenerse durante el almacenamiento y uso.

Como los microorganismos poseen la capacidad de contaminar a estos productos durante las etapas de elaboración y/o uso, estos compuestos conservadores son agregados principalmente para asegurar una estabilidad continua y seguridad de estos. Pero se deberá tener en cuenta que la principal prevención es trabajar con las normas de Buenas Prácticas de Elaboración y no utilizar estos compuestos inhibidores para "corregir" falencias de fabricación. Por eso existen además técnicas protectoras (áreas limpias con aire filtrado, aisladores, etc.) que pueden utilizarse en forma aislada o combinada con alguno de los conservadores.

Este problema posee mayor relevancia en los productos no esterilizados y por lo tanto pueden dar lugar a un riesgo potencial, especialmente en aquellas personas con defensas disminuidas.

El uso de estos compuestos reduce la probabilidad del crecimiento microbiano en los productos principalmente acuosos, así como minimizan la posibilidad de supervivencia en productos no acuosos. La carga microbiana deberá reducirse a un nivel aceptable para la seguridad del producto. Se tendrá en cuenta que los requisitos de nutrientes de la mayoría de los organismos saprófitos causantes de deterioro, se hallan por lo común en casi todas las formas farmacéuticas y cosméticas, muchos ingredientes son fácilmente biodegradables de igual forma que

cantidades trazas de residuos químicos contaminantes. El agua de uso farmacéutico puede contener trazas suficientes que permiten el crecimiento de muchos pseudomonadales y otras especies que habitualmente se asocian a alteración de productos, dado que el agua es ampliamente utilizada en estas industrias, tanto como materia prima o participando de algún proceso de producción [1].

Los compuestos añadidos a estos productos, también se los conoce como aditivos antimicrobianos, que se refiere a cualquier sustancia que no permita la multiplicación de los microorganismos, ya sea por una acción inhibitoria (*microbiostática*) o por una acción destructiva (*microbicida*) [2]

¿Como actúan los microorganismos en una contaminación?

Estos organismos poseen diversas actividades metabólicas las cuales conducen a una variedad amplia de alteraciones o daños para el producto o usuario respectivamente, así como en la estabilidad del producto, si se permite su persistencia.

Las diversas Farmacopeas establecen límites para la presencia de microorganismos en los fármacos, los cuales varían según el producto, su uso y las características del usuario final. Otras codificaciones y diversos investigadores discuten sobre las diversas regulaciones que deberían existir al respecto tanto para fármacos como para cosméticos.

Sobre los microorganismos que participan en esta acción los informes más comunes se refieren a pseudomonadales y otras bacterias Gram negativas en productos acuosos, mientras que en productos secos, tales como tabletas, comprimidos o polvos, se encuentran sobre todo esporos tanto bacterianos como de hongos, así como estafilococos y corynebacterias. El significado clínico sobre los medicamentos ha sido discutido por varios autores [1-3-4] y también las implicancias sobre el deterioro de producto [5-6].

Se deberá considerar por otra parte la constitución de un sistema preservativo [7], que no es sólo la sustancia que se añade como tal sino que además involucra a la formulación del producto medicinal o cosmético ya que la sustancia no obra independientemente de ésta; existen factores que inciden favorablemente o negativamente sobre la sustancia conservadora [8], tal como el pH, sustancias orgánicas, actividad de agua, agentes secuestrantes, temperatura de almacenamiento y aún el procesado mismo. Se tendrá en cuenta que todos estos elementos repercutirán sobre la estabilidad del conservador [9-10].

En síntesis, la efectividad de un conservador puede realzarse o puede disminuir por los constituyentes activos del preparado o formulación como así también por el envase o sistema de cierre que posee, dado la posibilidad de absorción del agente conservador por parte del material del envase.

Otro aspecto a tener en cuenta es que un conservador ideal no existe ya que éste debería cumplir una serie de atributos como ser [11]:

- Amplio espectro en su acción antimicrobiana
- Efectivo y estable frente a diferentes pH
- Químicamente estable
- Compatible con diferentes componentes de una formulación
- Compatibilidad con los envases
- No alterar las características del producto
- Poseer coeficiente de partición O/W adecuado
- No tóxico en concentraciones de uso
- Evitar adaptaciones de microorganismos a él
- Económico
- Cumplimentar con regulaciones vigentes

De estos atributos, surge claramente la imposibilidad de que solo un compuesto químico pueda reunir todos esos requisitos, pues muchos son afectados por una gran parte de ellos: por lo general si posee un amplio espectro para todos los microorganismos, podrían ser tóxicos, también podrían alterar el ambiente que los contiene, por

ejemplo, plásticos. En caso de ser activos solamente para determinados organismos (situación más común), puede apelarse a una combinación de agentes compatibles, que pueden complementarse y de esta forma disminuir las falencias de cada agente individual

En la Tabla I, se describen algunas propiedades generales de los principales conservadores y en la Tabla II, diversas características importantes.

Tabla I. *Propiedades generales de principales conservadores en fármacos*

Sustancias	Ejemplos	Actividad	Desventajas	Usos
Ácidos orgánicos	Benzoico Parabenos	Bacterias - Hongos	pH dependientes	Orales – Tópicos
Alcohólicos	Bencílico Etílico	Amplio: Bacterias - hongos	Penetración pobre en material orgánico	Orales - Inyectables Sinérgicos
Aldehídos	Glutaraldehído Formaldehído	Elevada: Esporas - Bacterias - Hongos - Virus	Inactiva las soluciones ácidas con temperatura Tóxicos	Esterilización química de instrumental en altas concentraciones
Biguánidos	Clorhexidina PHMG	Intermedia: Principalmente Gram positivos	Inactiva con material orgánico. Catiónicos	Productos oftálmicos
Halógenos	Cloro y Yodo	Elevada: Bacterias - Hongos -Virus	Inestables - corrosivos Inactiva materia orgánica	Usos limitados
Mercuriales	Timerosal Fenil Mercurio	Bacterias	Inactiva materia orgánica Tóxico	Oftálmicos Limitado en inyectables
Fenólicos	Cresol Clorocresol	Intermedio: Bacterias. - Hongos	Irritante. Contaminante ambiental	Cremas
Cuaternarios	Benzalconio Cetrimida	Baja: Principalmente Gram positivos	Disminuye la actividad con materia orgánica. Incompatible con aniónicos	Oftálmicos Cremas

Un aspecto que se deberá tener presente es que no todos los agentes químicos utilizados como conservadores pueden utilizarse para cualquier producto, ya que muchos de ellos no obran por igual en cuanto a su toxicidad y compatibilidad con los productos que los utiliza. A título de ejemplo en la Tabla III se enumeran algunos agentes conservantes y su aplicación en productos comerciales. [12].

Tabla II. *Características de otros conservadores utilizados en cosméticos*

Compuesto	Actividad	Solubilidad	Compatibilidad	Dosis
Diazolidinil urea (Germall II)	Gram positivos y negativos	muy soluble pH 3-9	positiva con la mayoría, se inactiva por dilución	0.1-0.5%
Imidazolidinil Urea (Germ.115)	Menor que Germall II	muy soluble	positiva con la mayoría, se inactiva por dilución	0.1-0.5%
Dehidroacético	Bacterias - Mohos y levaduras	3% en etanol < 0.1% en agua	Incompatible a pH alcalino, pH óptimo: 5 - 6.5	0.002-0.5%
Dimetilodimetil Hidantoína (Glydant)	Bacterias	Soluble en agua	Inactiva por dilución, pH óptimo: 5 - 6.5	0.15- 4 %
Fenoxietanol	Bacterias Gram negativas	2.6% en agua 2% en aceite o Alcohol	Tensioactivos aniónicos, y catiónicos. Incompatible con no iónicos. pH óptimo amplio	0.5-2%
Metilcloroisotiazo-Linona-metilisotiazolinona (Catón CG)	Bacterias – Mohos – Levaduras	Agua y alcohol	Con emulsificantes Iónicos y no iónicos pH óptimo 3.5 a < 8	0.035-0.15%
Triclosán (Irgasan DP-300)	Bacterias y Hongos	Etanol Aceite	Incompatibles con no iónicos. pH óptimo 4 – 8	0.1-0.3 %
Quaternium 15 (Dowicill 200)	Bacterias Gram positivas y negativas > que Hongos	Agua - glicoles	Con emulsificantes iónicos y no iónicos pH óptimo 4-10	0-02-0.3%

Tabla III. *Ejemplos de áreas de aplicación de diversos conservadores*

Compuesto	Inyectables	Oftálmicos	Tópicos	Orales
Bencílico	+		+	
Benzalconio	+	+	+	
Cetrimida		+	+	
Clorobutanol	+	+		
Clorhexidina	+	+	+	
Etanol				+
Feniletanol	+		+	
Fenol	+		+	
Fenoxietanol				
Parabenos*	(+)	(+)	+	+
Timerosal	+	+		

**Estos compuestos, desde 2004 dieron lugar a importantes debates, dado que se le atribuían propiedades de mimetizar a sustancias estrógenas, pero hasta hoy día no existen suficientes evidencias para no permitir su empleo en las dosis que normalmente se aceptan. Actualmente su uso está regulado o restringido en comunidad económica europea y lo mismo que en nuestro país, donde no se recomienda el uso de butil y propil parabenos en menores de 3 años (en el área cubierta por el pañal), es de esperar que salvo el metil parabeno, los demás dejen de utilizarse paulatinamente.*

Efectividad de los conservadores de acuerdo con diferentes metodologías

La gran variedad de agentes químicos utilizados en la conservación de los diferentes productos, si bien pueden extender la vida media de los mismos, muchas veces no alcanzan a cumplir con tal objetivo, por lo que es necesario proceder a evaluar la efectividad de la sustancia química añadida en un producto.

Para realizar tales ensayos deben tenerse en cuenta varios factores:

1) la metodología microbiológica a aplicar
2) la naturaleza de los ingredientes involucrados
3) el conservador añadido
4) el proceso de elaboración
5) los envases de los productos
6) la frecuencia de uso y
7) las condiciones de almacenamiento

La metodología analítica debe asegurar una recuperación de los microorganismos en forma eficiente a fin de poner de manifiesto la presencia o no de una actividad antimicrobiana adecuada por lo que se deberá demostrar la efectividad de la técnica de recuento previamente a la evaluación de la efectividad del agente antimicrobiano en la formulación [(14)].

Como fuente de guía para la realización de estos ensayos son cuatro las Organizaciones que establecieron las bases: CTFA, ASTM y USP y BP (*Cosmetic, Toiletry and Fragance Association; American Society for Testing Materials; US Pharmacopoeia; British Pharmacopoeia*, respectivamente), luego por otras farmacopeas y organizaciones. Dichas instituciones han desarrollado sus propias recomendaciones específicas, tanto para el ensayo en sí como para organismos de desafío utilizados, medios de cultivo y condiciones de crecimiento y almacenamiento. Requisitos que son estandarizados a fin de lograr respuestas reproducibles.

En cualquiera de esas metodologías, los resultados se interpretan luego de un período de incubación de 28 días, dejándose asentado que, si bien en la mayoría de esos ensayos se utilizan microorganismos similares, no todos usan las mismas especies, como puede apreciarse en el cuadro, pero todos emplean representaciones de bacterias Gram negativas, y positivas, así como representantes de Hongos y levaduras.

En general, el ensayo debe validarse para el producto a fin de asegurar el diluyente correcto para la sobrevivencia de los microorganismos. En forma sintética consiste en inocular al producto con una misma especie o con un pool de organismos según las técnicas utilizadas. El producto se deja estar a temperatura ambiente o a temperaturas especificadas durante períodos de tiempo prefijados y hasta 28 días, examinándose para determinar los microorganismos sobrevivientes en cada tiempo señalado.

En la Tabla IV, se especifican los microorganismos sugeridos por las diversas metodologías oficiales.

Puede apreciarse que en los ensayos de Farmacopeas, que son los más utilizados, prácticamente se utilizan 5 microorganismos: 3 bacterias y 2 hongos (una levadura y un hongo filamentoso) no obstante en los ensayos pueden añadirse otros organismos, por ejemplo si hay una constante presencia de algún microorganismo fastidioso en algún punto del proceso productivo puede (y debería) añadirse el mismo.

Según algunas técnicas, el desafío frente a los microorganismos puede hacerse con una mezcla de varias cepas, a fin de lograr un desafío más realista; al respecto, no hay un criterio uniforme. Según algunos autores [(5)] las mezclas pueden presentar un mayor desafío que los cultivos simples, ya que puede haber un efecto sinérgico entre los diferentes microorganismos que podrían disminuir la efectividad del conservador. CTFA señala que puede utilizarse tanto un cultivo puro como una mezcla, en este caso podría realizarse en las fases de desarrollo de una formulación. Las Farmacopeas han armonizado la inoculación de los microorganismos por separado.

Las bacterias que se utilizan como inóculo parten de una solución madre que contenga una concentración de 1 x 10^8 UFC/ ml que se diluye posteriormente al 1% en el producto dando en el desafío una concentración final de 1 x 10^6 UFC/ ml/ g. Con este volumen de inóculo se reduce la dilución del producto.

El tamaño del inóculo final varía ligeramente en los diferentes sistemas:

Para USP, BP, CTFA y ASTM las bacterias se hallan en la concentración anteriormente especificada y los hongos en 10^{4-5} UFC/ ml/ g.

Tabla IV. *Microorganismos de prueba*

Organismos	CTFA	ASTM	USP	BP	*ATCC**
E. aerogenes		+			*13048*
E. coli	(+)		+		*8739*
Proteus spp	(+)				
P. aeruginosa	(+)	+	+		*9027*
	+			+	*19429 / 15442*
S. aureus	+	+	+	+	*6538*
B. subtilis v. globigii	(+)				
S. epidermidis	(+)				
A. fumigatus	(+)				
A. brasiliensis		+	+	+	*16404*
C. parapsilopsis	(+)				
C. albicans		+	+	+	*10231*
P. levitum		+			*10464*

Referencias: (+): presencia con colección no especificada

*: o colección equivalente

Procedimientos

CTFA [15]: La concentración de microorganismo utilizada en el ensayo de acuerdo con lo especificado anteriormente, se añade a unos 20 g/ ml de producto. Esta metodología aconseja utilizar una sola especie por muestra de producto, a fin de obtener respuestas más específicas.

Luego de la inoculación se homogeneiza adecuadamente el producto. Posteriormente se pesa una alícuota de producto o preferentemente 1 gramo se diluye en caldo 9 ml de antagonista a fin de inactivar al conservador presente. Pueden realizarse más diluciones en forma decimal. Si no se dispone de un correcto antagonista, se realiza dilución o se filtra por membrana, técnicas que permiten ayudar a la inactivación del agente y a la recuperación de los microorganismos presentes.

De las diluciones se siembra una cantidad preestablecida (0.5-1 ml) en placas de Petri y se añade el medio de cultivo con antagonista fundido y mantenido a una temperatura de unos 47 °C. Las muestras inoculadas se incuban temperatura adecuada (30 – 35 °C para bacterias y entre 22 a 28 °C para hongos)

Las incubaciones se realizan durante diversos tiempos, (0- 1- 2- 3- 7- 14- 28 días), según la metodología y productos utilizados.

Neutralización:

Esta metodología recomienda como antagonistas caldo Letheen Lecitina y Triton X-100, o Caldo Tioglicolato; aunque lecitina más Tween 80 añadido al medio de cultivo es suficiente para una gran cantidad de conservadores.

El agente neutralizante puede incorporarse en la placa de cultivo o juntamente al medio

ASTM [16]: Los microorganismos utilizados difieren del procedimiento anterior (Tabla IV). El método aconseja agar nutritivo para bacterias y Agar Mycophil a pH 4.7 para levaduras y hongos.

El procedimiento permite ser utilizado en dos tipos de desafío: a) con cultivos mezclados y b) con cultivos puros. El primero se efectúa con tres inóculos separados: 1) mezcla de bacterias Gram positivos, 2) mezcla de bacterias Gram negativos y 3) mezcla de levaduras y mohos. Para determinar el número de UFC el método emplea

diluciones seriadas. La incubación se realiza a 32°C durante 24 h para bacterias y levaduras y a 25° C durante 72 horas para mohos.

Se sugiere preparar tres muestras de 100 g en frascos de vidrio con tapa e inocular cada uno con 1 ml de suspensión señalada con anterioridad. Las muestras inoculadas se homogeneizan y dejadas a temperatura ambiente durante diversos tiempos (0- 7- 14- 21- 28 días), a cada uno de estos períodos, 1 g de producto se mezcla con 9 ml de caldo con antagonista y efectuando otra dilución adicional a fin de realizar los recuentos de sobrevivientes correspondientes. La neutralización se realiza en forma similar que en el método anterior.

El criterio de aprobación de esta metodología requiere que las bacterias, levaduras y hongos deberían disminuir en 3 log dentro de los 7 días y no debería haber crecimiento dentro de los 28 días.

USP [17]: Los organismos que se utilizan se especifican en la Tabla IV. Cultivos madres se preparan sobre TSA agar o caldo, y Sabouraud Dextrosa agar o caldo para levaduras y hongos y se incuban a temperatura adecuada durante 24 h las bacterias, 48 h las levaduras y 1 semana los hongos. Se suspenden en solución fisiológica (9/1000 de cloruro de sodio), los hongos se suspenden en solución fisiológica más 0.05% de Tween 80. Las concentraciones de microorganismos y de esporos de hongos se ajustan a 1 x 10^8 UFC/ml. Las diluciones de organismos utilizados en el ensayo se especifican en la Tabla VI.

Se toma 20 ml/g de producto en condiciones estériles en un frasco adecuado o en el envase original y estéril (o en el envase original si este lo permite) y se inoculan con 0.1 ml de suspensión microbiana. Se homogeneiza y dejan a temperatura entre 20 y 25 °C, examinándose luego de los días 0- 7- 14- 28.

El criterio de aceptación requiere que el producto se halla adecuadamente conservado si reduce las bacterias 3 log a los 14 días según la categoría del producto. Las levaduras y Hongos deben disminuir o no modificarse en ese tiempo. (ver Tabla VII)

BP [18]: Los organismos que se utilizan en esta metodología se especifican en la Tabla IV, no emplea *E. coli,* pero puede añadirse cuando puede representar un peligro para el preparado, por ejemplo *E. coli* ATCC 8739 o de colección equivalente, suele utilizarse para las preparaciones orales, así como *Zigosaccharomyces rouxii* en los preparados orales con alta concentración de azúcar. Los cultivos madres se preparan sobre TSA agar las bacterias y en Sabouraud Agar los hongos y se incuban a temperatura adecuada durante 24 h las bacterias, 48 h las levaduras y 1 semana los hongos hasta obtener buena esporulación. Se suspenden en solución fisiológica (9/1000 de cloruro de sodio), los hongos se suspenden en solución fisiológica más 0.05% de Tween 80. Las concentraciones de microorganismos y de esporos de hongos se ajustan a 1 x 10^8 UFC/ml. Las diluciones de organismos utilizados en el ensayo se especifican en la Tabla VI.

Se toma 20 ml/g de producto en condiciones estériles en un frasco adecuado y estéril y se inoculan con 0.1 ml de suspensión microbiana. Se homogeneiza y dejan a temperatura entre 20 y 25 °C, examinándose luego de 0- 6- 48 h y 7- 14- 28 días.

El criterio de aceptación requiere que el producto se halla adecuadamente conservado si reduce las bacterias 3 log a los 14 días. Las levaduras y mohos deben disminuir o no modificarse en ese tiempo.

El procedimiento es similar al descripto para USP, incubándose a igual temperatura y analizando una cantidad adecuada de cada uno de los contenedores luego de los tiempos establecidos.

El criterio de aceptación se basa según las zonas donde se aplican los preparados, ya sea para *productos parenterales y oftálmicos; Productos orales; Preparados tópicos y Preparados para oídos,* ver tabla VII.

Farmacopea Europea [19]: La metodología es similar a **BP,** variando ligeramente en la interpretación de resultados, ver tabla VII.

Otros procedimientos:

Dado que el tiempo final que se emplean en los métodos oficiales es de 28 días, resultaría un período muy largo para un producto en estudio, más si se tiene en cuenta que algunas veces requieren re-enfrentamientos, dicho tiempo se extendería mucho más. Por tal razón algunos investigadores han propuesto métodos más cortos a fin de obviar esa dificultad. Tales métodos, llamados "Procedimientos Acelerados" son interesantes como método preliminar a fin de detectar una formulación inadecuadamente conservada; su confiabilidad y reproducibilidad lo hace recomendable para las etapas tempranas en el desarrollo de un sistema preservativo de un producto, pero no reemplazan a los procedimientos de Farmacopea.

Entre ellos se encuentran el **Método de Regresión Lineal de Orth** [20] donde determina valores **D**. Este autor señala que cada organismo posee una tasa de muerte característica, y puede predecir el tiempo requerido para determinar el tiempo de desafío. El método permite medir los valores de **D** para los microorganismos de prueba en las muestras del producto, hallándose que es un método confiable para observar el tipo y concentración de conservador en productos acuosos.

Una debilidad del método es que asume una relación lineal entre el tiempo de exposición al biocida y el log del número de microorganismos sobrevivientes, pero debe asumirse que diferentes microorganismos poseen características fisiológicas y metabólicas distintas, por lo que pueden presentar diferencias en las velocidades de muerte frente a un tratamiento letal.

El ensayo se realiza con los microorganismos especificados en USP y en las mismas condiciones, inoculando 0.1 ml de una suspensión microbiana en 50 ml de muestra. Se homogeneiza y se realiza un recuento en el tiempo inicial y luego de 2, 4, 24 y 48 h para bacterias, y 4, 8, 24 y 48 h para hongos.

Como criterio de aceptación se utiliza un **D** menor o igual a 4 para bacterias patógenas, por g o ml, lo que indicaría que en 24 h hay una inactivación total de las mismas y un **D** menor o igual a 28 h para no patógenos, mohos y levaduras.

Otro ensayo rápido es el de **Preservación Acelerada**, que es un ensayo similar al de Orth, difiriendo solamente en que las lecturas se realizan a los 2 y 7 días para las bacterias y a los 2, 7 y 12 días para hongos.

Chan y Bruce [21], proponen un **Ensayo Rápido de Efectividad** que es un examen presuntivo de adaptación del estudio empleado en clínica como CIM, (concentración inhibitoria mínima). Se utilizan los mismos organismos que los especificados en USP. Los medios de cultivo y antagonistas son similares en las distintas metodologías. Se trata de establecer la capacidad del producto en prevenir el crecimiento de $I0^6$ organismos luego de 24 h. La transferencia se realiza con un ansa sembrando en placa de Petri conteniendo medio de cultivo con antagonista. La actividad se mide de acuerdo con una escala que va desde 0, o ausencia de desarrollo que indica gran actividad, hasta un número de colonias equivalente al 100% del control (inactividad). Se considera un valor en el borde con un 50 % de desarrollo del control. Este tipo de ensayo que puede durar aproximadamente 48 h es semicuantitativo, requiriéndose poca muestra y es rápido para evaluar un grupo grande de muestras.

Ensayos de Capacidad. Esta metodología establece la eficacia de una concentración de conservador en un producto supuestamente conservado.

Una suspensión de una mezcla de microorganismos se coloca en medios adecuados y se deja desarrollar durante 48 h. En el ensayo propuesto por Barnes y Denton [22] las mezclas que utiliza son: 1) Bacterias Gram positivas, *2)* Bacterias Gram negativas, 3) Bacterias esporuladas; 4) Esporas de hongos y 5) Levaduras.

El ensayo requiere que 1 ml de mezcla microbiana se añada a 20 g de producto con el conservador incorporado: las muestras se dejan a temperatura ambiente durante 48 h, posteriormente con un ansa se realizan estrías sobre medio de cultivo con el antagonista que corresponda y se incuban a 35 °C las bacterias durante 24 h y a 25 °C durante 48 h los hongos. El ciclo se repite con re-inoculaciones durante 15 veces.

El conservador debe reducir el número de organismos viables de una inoculación unos 3 log en las 48 h para dar lugar a un resultado negativo. Esta capacidad disminuye gradualmente debido a la dilución del biocida en las re-inoculaciones.

En todos los procedimientos vale recordar que la preparación del inoculo para el ensayo se realiza con un cultivo madre (stock) a través de un medio de cultivo como el TSA y/o Sabouraud. Posteriormente los organismos son subcultivados regularmente por lo general cada 4 semanas. Para el ensayo propiamente dicho, la bacteria se subcultiva durante 24 horas, mientras que el hongo *A. brasiliensis* puede requerir entre 3 a 5 días a fin de que den lugar a la formación de esporas.

Las células se suspenden en agua peptonada 1/1000 o solución fisiológica. En el caso de *A. brasiliensis,* se añade una concentración baja de Tween 80 (0.05%) para facilitar la suspensión, pudiéndose además agitar con perlitas de vidrio estériles. Las suspensiones stock ser llevan a una concentración de 10^8 UFC por ml. En el ensayo se lleva a una concentración de 10^6 UFC/ml para las bacterias y de 10^{4-5} UFC para los hongos.

Doble desafío acelerado (ADT): esta metodología, procede, en forma similar a USP, pero utiliza coctel de bacterias (*E. coli, P. aeruginosa y S. aureus)* y de mohos y levaduras (*C. albicans* y *A. brasiliensis*), utilizando un inoculo de 1 x 10^6 UFC/ ml. Recuento a días 1, 3, y 7. Reinoculación a día 7. Nuevo recuento a días 8, 10 y 14. Criterio de aceptabilidad: Bacterias: Día 7 < 10 UFC; Día 14 caída de 5 log; Mohos y levaduras día 7 caída de 3 log. Y día 14 caída de 3 log.

Es un método que predice muy bien el ensayo de Farmacopeas, pero dura la mitad del tiempo.

Si bien no existe un método simple para resolver todas las necesidades, cada fabricante deberá determinar cuál de ellos es el más adecuado, ya sea para cumplimentar con aspectos regulatorios o para obtener resultados rápidos.

Los objetivos de los ensayos es la de aportar resultados reproducibles que ayuden a determinar la calidad de un producto.

Otro hecho a tener en cuenta es que la confiabilidad de un método nuevo para determinar efectividad de un conservador requiere de la validación del mismo. En general cualquier método debe ser validado, para asegurarnos la confianza y exactitud que nos brinda, por otra parte es muy importante considerar la habilidad y cuidado del analista. Para ello se impone recordar en estos casos incluir

- selección apropiada del microorganismo a ensayar y su crecimiento en forma estandarizada.
- empleo de un buen sistema de recuperación de los organismos y realización de los ensayos en forma establecida y aceptable.

Empleo de antagonistas o neutralizadores

El uso de neutralizadores es para inactivar al conservador de su acción biocida. Si no fuera así la acción de este agente puede continuar en el medio de recuperación distorsionando la interpretación de los resultados.

La neutralización por lo general puede ser química, añadiendo determinados agentes inactivantes, como se señala en la Tabla V. Pero algunos biocidas son dificultosos de inactivar por ejemplo para los aldehídos (formaldehído, glutaraldehído), puede utilizarse bisulfito de sodio, pero esta sustancia también puede inhibir el crecimiento de bacterias o la germinación de esporos. Por eso es necesario asegurar la no toxicidad del antagonista con los microorganismos. El medio de Engley-Dey [23] propone una composición universal para la neutralización de una gran cantidad de conservadores.

Por otra parte muchos medios comerciales poseen sustancias neutralizadoras.

Otros procedimientos de neutralización son mediante el empleo de medios físicos como ser la **dilución y la filtración por membrana**. Algunos conservadores son muy sensibles a la concentración y su actividad se anula por una dilución, esto es debido a que son dependientes de su **factor de concentración " η ",** cuanto más elevado sea, mayor será la influencia de una dilución en la anulación de su actividad (ver Desinfectante y

desinfección de áreas y equipos)[2] así por ejemplo el fenol posee un "n" de 6 lo que señalaría que una simple dilución al doble de su concentración específica de acción, su actividad disminuye 64 veces (prácticamente se anula).

La filtración por membrana resulta asímismo muy útil: las bacterias se aíslan sobre el filtro y luego se enjuagan hasta liberarlas del conservador. Posteriormente las bacterias son transferidas a un medio de cultivo a fin de efectuar el recuento correspondiente.

Tabla V. *Antagonismo de Conservadores*

SUSTANCIAS	AGENTES NEUTRALIZANTES
Alcoholes	Dilución-Tween 80
Aldehídos (formaldehído-glutaraldehído)	Glicina-gelatina-sulfito de sodio
Amonio cuaternario	Lecitina + lubrol ∗ (2-lauryloxietanol); Tween 80, 3%; agentes aniónicos
Benzoatos	Dilución – Tween 80
Biguánidos	Lecitina; Tween 80, 3%; agentes aniónicos
Bronopol	pH alcalino; cisteína; metabisulfito sódico
Dowicide 200	Lecitina, aniónicos, no iónicos, talco, Temp.>50 °C, CMC
Fenólicos	Dilución- Tween 80
Germal (2-115)	No iónicos, bentonita, Temp.>75 °C, CMC
Glicoles	Dilución, Tween 80
Halógenos	Tiosulfato sódico-Tween 80
Hidrogeno peróxido	Catalasa
Kathon CG	Dilución en caldo nutritivo
Parabenos	pH >8; Tween 80
Tego	Tween 80
Triclosán	Lecitina -Tween 80

Tabla VI. *Rasgos sinópticos de las diversas características. Para tener en cuenta en diferentes ensayos de desafío*

Muestra a utilizar	20 g/ ml
Volumen incorporado	0.01 ml de suspensión microbiana (menos del 1%)
Microorganismos usados	Bacterias, levaduras, hongos, puros o mixtos (ver metodología)
Concentración bacteriana	10^6 / ml/ g
Concentración de Eumycetes	10^{4-5} / ml/ g
Medios de cultivos	Triptona Soya Agar (TSA), Agar Sabouraud
Procedimiento de recuento	Por agar fundido en placa
Temperatura incubación	Temp. ambiente/ 30-35 °C- bact. 25-30 °C- eumycetes
Tiempo de incubación	24 h/ bacterias, 72 h eumycetes
Metodología utilizada	Ver Procedimientos
Soluciones neutralizantes	Ver Tabla V

Ensayos de poder biocida del neutralizante

ASTM [24] sugiere un experimento a fin de señalar si el empleo de un agente neutralizante es efectivo y carece de toxicidad: El ensayo se realiza determinando en primer lugar la máxima concentración tolerada del agente inactivador en un medio de cultivo apropiado. Posteriormente se añade el microorganismo de estudio y se determina el recuento microbiano a 0 y 30 minutos.

El medio de cultivo utilizado no debe permitir un descenso microbiano significativo luego de 30 minutos.

Se añaden varias concentraciones del agente neutralizante al medio de cultivo y se comparan los sobrevivientes luego de la exposición a 30 minutos. La comparación produce una concentración del agente antagonista que no disminuye la concentración de microorganismos en ese tiempo.

Se tendrá en cuenta que la seguridad por la cual se efectúa el recuento de los organismos sobrevivientes permitirá señalar la real efectividad del conservador en estudio, por lo que se deberá extremar la completa neutralización del mismo durante el plaqueo a fin de evitar una inhibición de desarrollo con el residuo del conservador.

***Tabla VII**: Interpretaciones de las diferentes Reglamentaciones*

METODOLOGIA	BACTERIAS	HONGOS
USP Oftálmicos **Tópicos** **Orales**	3 log en 14 días 2 log en 14 días 1 log en 14 días	No aumenta en 14 y en 28 días
BP Oftálmicos **Tópicos** **Orales**	3 log en 6 h 3 log en 48 h 2 log en 7 días	2 log en 14 días 2 log en 14 días No aumenta en 14 días
PhEur Oftálmicos y parenterales **Tópicos** **Orales**	2 log en 6 h – 3 /24 h *(1 log en 24 h -3/7 días)* 2 log en 48 h 3 log 7 días *(3 log en 14 días)* 3 log en 14 días	2 log en 7 días *(1 log en 14 días)* 2 log en 14 días *(1 log en 14 días)* 1 log en 14 días
CTFA	3 log en 7 días	1 log en 7 días
ASTM	3 log en 7 días No incremento en tiempos sucesivos	Levaduras 3 log en 7 días Hongos 1 log en 28 días No incremento en tiempos sucesivos
Regresión Lineal	D < 4 h patógenos D < 28 h no patógenos	D < 28 h no patógenos
Preservación Acelerada	2-3 log en 48 h No recuperación / 7 días	No recuperación en 2- 7 y 12 días

Referencias de la tabla VII: Sin paréntesis: satisfactoria. / Entre paréntesis y en itálica: satisfactoria cuando no puede hallarse la efectividad recomendada.

La interpretación de los resultados se asienta en los requisitos de los organismos reguladores o metodologías llevadas a cabo por diferentes autores. En la Tabla VII se sintetizan los mismos. La prueba es aplicable no solamente durante el diseño de un producto sino a lo largo de la vida del mismo. Por lo común se realiza al comienzo y final de este período.

Observando la Tabla VII, puede apreciarse que las interpretaciones, de las diversas metodologías pueden homologarse si tomamos el criterio del valor D, de la Regresión Lineal, que es muy exigente, en la Tabla VIII, se señalan las equivalencias.

En todos los casos los valores expuestos equivalen en horas los valores de la Tabla VII para obtener un logaritmo de muerte, es decir D, teniendo en cuenta las exigencias más elevadas en el caso de UE, BP y USP, se entiende que 56, equivale a una reducción de 3 log en 7 días: 84, a una reducción de 2 log en 7 días; 112, a una reducción de 3 log en 24 días; 168 a una reducción de 1 log en 7 días.

Tabla VIII: *Relaciones de los diversos métodos con D (en horas)*

Microorga Mismos	Regresión Lineal	Preservación Acelerada	ASTM	CTFA	UE	BP	USP
Bacterias	<4	24	56	56	4	4	112
Eumycetes	<28	NC	NC	168	168	168	NC

Referencia: NC = no corresponde efectuar el cálculo.

Se deduce muy bien que el primer método es mucho más exigente, comparado con los métodos oficiales de ASTM, CTFA y USP, con excepción de la BP y Europea para productos oftálmicos, que lo son más, no obstante estos últimos son los utilizados en la mayor parte de casos en que se requiere una regulación oficial, reservándose los rápidos para acelerar determinaciones en los diseños de productos.

Bibliografía

1. Tenenbaum S. *Pseudomonads in cosmetics*, J. Soc. Cosmet.Chem. 8,797,1967
2. D'Aquino M., Rezk R., *Desinfección*, UDEBA Ed.1995
3. Wilson L.A., Ahearn D.G., *Pseudomonas-induced corneal ulcers associated with contaminated eye mascaras*. Am.J. Ofhtalmol. 84,112,1997
4. Block SS., *Disinfection Sterilization and Preservation* 4th. Ed. Lea & Febiger, Philadelphia,1992
5. Cowen R.A., Steiger B., *Antimicrobial activity: a critical review of test methods of preservative efficacy*. J.Soc.Cosmet.Chem.,23, 703,1972
6. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, 8th.ed. 2001
7. Cowen R.A., Steiger B., *Why a preservative system must be tailored to a specific product*. Cosmet. Toilet 92(3) 15-16,1977
8. Orth D.S., Milstein S.R., *Rational development of preservative systems for cosmetic products*. Cosmet. Toilet 104:91-103,1989
9. Blomfield S.F. *Control of microbial contamination in non-sterile pharmaceuticals, cosmetics and toiletries*. In Blomfield S.F., Baird R., Leak, R.E. and Leech R.(eds) *Microbial Quality Assurance in Pharmaceuticals, Cosmetics and Toiletries*, Ellis Horwood. Chichester, pp 9-14
10. Russell, A.D. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. In Russell, A.D. Hugo W.B. and Ayliffe G.A. J (eds) *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*. Blavckell Scientific Publications. Oxford pp 107-133
11. Norma de Castro Sira, María Luisa de Curtis de Fernández. *Preservación en Cosméticos. Pieza Clave de la Calidad*. U.C.de Venezuela. Fac. Farmacia 1997
12. Denyer S., Baird R. *Guide to Microbiological Control in Pharmaceutical*. 1990
13. D'Aquino M. *Aditivos antimicrobianos utilizados en alimentos, fármacos y cosméticos. Posibles efectos adversos.* Rev. Farm. Reviews. 153(1-2):43-58,2011
14. Sutton Scout V.W. *Antimicrobial preservative efficacy and microbial content testing in Cosmetic Microbiology, a practical approach*, Ed. Philip A. Geiss 2° ed. Taylor & Francis Group 2006.
15. CTFA-Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Microbiology Guidelines. Curry A., McEwen (eds.) Washington D.C.
16. ASTM. American Society for Testing and Materials, in Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, 1991.
17. USP 40 ed.2017.
18. British Pharmacopeia
19. UE. Europea Pharmacopeia 3a-ed.2000
20. Orth D.S. Linear Regression *Method for rapid determination of preservative efficacy*. J. Soc. Cosmet. Chem 30:321-322.1979.
21. Chan M., Bruce H.N. *A rapid screening test for ranking preservative efficacy*. Drug Cosmet. Ind. 128:34-37, 1981
22. Barnes M., Denton G.W. *Capacity tests for the evaluation of preservatives in formulations. Soap* Perf. Cosmet. October 729, 1969.
23. Engley F.B.Jr.. Dey B.P., *A universal neutralizing medium for antimicrobial chemicals*, in Proceedings of the 56th Mid-Year Meeting of the Chemical Specialities Manufacturers Association, N. York 1970
24. ASTM Evaluating Inactivators of Antimicrobial Agents in Disinfectant, Sanitizer and Antiseptic Products, Philadelphia 1991, p1054.