

Trabajo Práctico N° 3: **Preparación del material para el trabajo en Microbiología** **Limpieza y Esterilización**

INTRODUCCIÓN

En el trabajo del laboratorio de Microbiología tienen importantísima aplicación los procedimientos, técnicas y productos que suprimen o disminuyen la vitalidad de los microorganismos patógenos.

No existe un procedimiento de esterilización y desinfección aplicable a todos los casos. El método de esterilización será seleccionado para cada caso teniendo en cuenta la naturaleza física del objeto y la naturaleza biológica del contaminante. Como rara vez se conoce la población de microorganismos sobre un objeto que debe ser tratado, debemos presuponer que se encuentran presentes las formas microbianas mas resistentes: las endosporas.

El método de esterilización a emplearse debe ser previamente valorado.

Actualmente existen valores tabulados de tiempo de exposición, temperatura y concentración de principios activos para los métodos de esterilización más usados que nos permiten elegir el más adecuado para cada caso. En la elección debe tenerse en cuenta también el uso posterior que le será dado (o no) al objeto a esterilizar.

Para asegurar el éxito de un proceso esterilizante es necesario considerar las siguientes pautas:

1. Esterilización previa: Será necesaria cuando el material y/ o equipos hayan sido utilizados con material infeccioso o presunto infeccioso, por ejemplo placas de Petri inoculadas, tubos conteniendo cultivos de microorganismos, frascos empleados en el cepario, etc. Serán esterilizados en autoclave a 1 atm. de presión durante 15 – 30 minutos.

Para las pipetas, micropipetas y tubos de hemólisis puede emplearse este método o sumergirlas inmediatamente después de ser utilizadas en solución desinfectante de formol al 10 % durante una hora.

2. Limpieza previa: Se realizará para eliminar las partes gruesas de suciedad o residuos no infecciosos (gratitud, resto de pegamento, cinta adhesiva, carbono, tinta de rotulado, etc.). Se empleará el raspado con espátulas, cepillo, esponjas metálicas, paños, etc. Se enjuagará repetidas veces bajo el chorro de agua corriente a presión (conectando a la canilla un tapón perforado o tapando parcialmente con un dedo). Se aconseja un último enjuague con agua destilada. Se dejará secar en canasto o rejilla de alambre boca abajo a temperatura ambiente o estufa a 60 – 80 °C.

El material de vidrio que luego de este tratamiento aún quedase manchado será sumergido en una solución sulfocrómica durante 24 hs (Este procedimiento lo realiza personal especializado del Droguero).

3. Preparación del material de vidrio: este acondicionamiento debe realizarse de manera tal de asegurar la perfecta esterilización del mismo en todos sus puntos y evitar la posterior contaminación.

a. Placas de Petri: se envuelven en papel madera según la técnica indicada por el instructor (se esterilizan en estufa a 160- 180°C durante dos o una hora respectivamente).

b. Tubos de ensayos, tubos de hemólisis y tubos de Khan: se confecciona en tapón de algodón y se cubre con un capuchón de papel aluminio. (se esterilizan en estufa).

c. Pipetas: se obtura el extremo superior con un filtro de algodón y luego se envuelven con tiras de 4 a 5 cm. de ancho de papel madera comenzando por la punta de la misma. Debe rotularse cada una con la capacidad y graduación correspondiente (se esterilizan en estufa).

ESTERILIZACIÓN

La esterilización es la muerte y/ o eliminación de todo microorganismo. No existen grados de esterilidad, un objeto es estéril o no lo es.

La dinámica de la esterilización dice que la proporción de microorganismos muertos en iguales periodos de tiempo es constante. A mayor temperatura, mayor acción y menos tiempo necesario para esterilizar. Esto es válido para cualquier procedimiento químico o físico excepto filtración.

Los métodos de esterilización se clasifican en :

1-FÍSICOS:

1- **A) CALOR:** Actúa por desnaturalización de proteínas y contribuye a la fusión de lípidos de membranas.

CALOR HÚMEDO: la desnaturalización y coagulación se facilita en presencia de agua pues se rompen los puentes de hidrógeno entre los grupos $C = O \cdots HN$ que constituye la estructura secundaria y se agrega (también mediante puente de hidrógeno) una molécula de agua a cada extremo de esas uniones rotas. Las proteínas en soluciones más diluidas coagulan a menor temperatura que las concentradas. Esterilizar exclusivamente en calor húmedo: medios de cultivos, recipientes contaminados, material de goma, y todo elemento que no resista las altas temperaturas del calor seco.

El autoclave utiliza vapor a presión superior a la normal. Así, la temperatura del vapor de agua asciende a 121°C. El vapor saturado penetra en los recipientes tomando contacto con los microorganismos a destruir, allí se condensa liberando calor. El calentamiento es rápido por la gran cantidad de calor latente del vapor de agua, que libera al condensarse sobre la superficie del objeto.

CALOR SECO: Deshidrata las bacterias, virus, etc. y facilita la coagulación o desnaturalización de las proteínas. Se requieren mayores temperaturas para producir daño irreversible (muerte). Se acepta que el calor seco actúe oxidando los constituyentes intracelulares. En el proceso de esterilización son prioritarios los procesos oxidativos y de fusión de membranas por sobre la desnaturalización. Resulta lento por la menor eficacia del calor seco y por la lentitud del transporte del calor (convección y radiación).

NOTA:

Esterilizar exclusivamente a calor seco: Cera, vaselina, talco, recipientes cerrados herméticos de vidrio o metálicos sin filo.

1-B) RADIACIONES

Luz ultravioleta: solamente para aire o para superficie o capas muy delgadas de líquidos pues no penetra. Se usa para consultorios, salas, laboratorios, cámaras, quirófanos. No atraviesan el vidrio. Las ondas UV tienen suficiente energía para causar roturas en el ADN, produciendo la muerte del organismo expuesto. Las cámaras de siembra vienen equipadas con una lámpara de luz UV para mantener el área estéril, la cual se debe apagar cuando se ingresa a la cabina por la peligrosidad a la exposición de las radiaciones (quemaduras, eritemas, cáncer de piel)

2-C) MECÁNICOS:

Filtración: para medios de cultivo, sueros y soluciones que se alteren con el calor. En la mayoría de los filtros hay tres factores principales que intervienen en la retención de partículas (bacterias, virus, proteínas, etc.):

- a) Efecto mecánico de filtro, según el tamaño del poro.
- b) Repulsión o atracción eléctrica
- c) Absorción y adsorción

Por b y c pueden resultar que el filtro retenga partículas menores que el diámetro del poro. La mayoría de los filtros bacterianos tienen cargas negativas igual que las bacterias y los virus. Se disminuye la retención por ésta causa, trabajando a pH entre 7 y 6.

Ultrafiltración: para separación y medición de virus. Membranas de ésteres de celulosa biológicamente inertes que no retienen partículas por adsorción por lo tanto la retención de partículas depende principalmente del tamaño de los poros.

2- QUÍMICOS:

Desinfectantes: son agentes antimicrobianos capaces de matar los microorganismos patógenos (infecciosos) de un material. Pueden (y en muchos casos suelen) presentar efectos tóxicos sobre tejidos vivos, por lo que se suelen emplear sólo sobre materiales inertes.

Esterilización por gas plasma: Es una de las tecnologías posibles para esterilizar material termosensible.

Consiste en crear un plasma (estado entre líquido y gas), aplicando una radiofrecuencia a Peroxido de Hidrógeno que ejerce la acción biocida. El plasma es considerado como el cuarto estado de la materia consistente en un conjunto de iones, electrones y partículas atómicas neutras.

Tiene la ventaja de no dejar ningún residuo tóxico ya que se convierte en agua y oxígeno al final del proceso. El material no precisa aireación. El ciclo de esterilización es corto, dura entre 54 y 75 minutos.

Esterilización con óxido de etileno: este método se aplica a materiales termosensibles, sondas, instrumental vario. Este gas se administra mediante un autoclave especial. Para ejercer su efecto necesita humedad y una temperatura moderada (60°C). La desventaja es que genera residuos contaminantes que deben recibir tratamiento antes de ser desechados. El material tratado debe ser sometido a aireación forzada para eliminar los residuos tóxicos. El personal debe protegerse adecuadamente.

ACTIVIDADES

1. Esterilizar el material usado presuntamente infeccioso en autoclave (decontaminación)
2. Limpiar los materiales reutilizables decontaminados.
3. Acondicionar el material limpio para ser esterilizado.
 - a) placas de Petri
 - b) pipetas
 - c) tubos de ensayos

Autoclave: (Vapor a presión)

Para lograr una esterilidad confiable el método estándar es el vapor saturado, en autoclave, a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos. En el caso de decontaminación el tiempo puede extenderse a 30 minutos. Esta temperatura se logra por vapor de agua a una atmósfera de presión sobre la presión atmosférica.

Los recipientes a colocar en el autoclave no deben estar totalmente llenos y deben tener tapas flojas o estar tapados con algodón con una sobretapa para permitir la ebullición libre y la liberación del aire disuelto.

Para grandes volúmenes de líquidos se debe permitir un mayor tiempo de purgado. Este método se utiliza para esterilizar medios de cultivos y soluciones. En el caso de líquidos, éstos no deben formar emulsiones con el agua como Ej: aceite o vaselina.

También se utiliza para esterilizar ropa de cama o material textil en general, siempre que el autoclave esté provisto de un sistema de secado por vacío.

Normas de uso generales del autoclave

La utilización del autoclave comprende los siguientes pasos:

- a. Controlar el nivel de agua: en caso necesario, completar con agua corriente
- b. Mantener la posición abierta de la espita
- c. Controlar las funciones de la válvula de seguridad
- d. Introducir el material a esterilizar.
- e. Cerrar la tapa
- f. Encender la fuente de calor
- g. Purgar para eliminar el aire de la cámara de esterilización
- h. Cerrar la espita.
- i. Cuando se alcanza la presión (indicadora de la temperatura) deseada se comienza a contar el tiempo de esterilización.
- j. Una vez concluido el proceso, apagar la fuente de calor y dejar disminuir la presión espontáneamente. No enfriar artificialmente el autoclave.
- k. Cuando el manómetro indica que la presión ha llegado a cero abrir la espita a fin de equilibrar la presión.

Abrir el autoclave y retirar el material estéril.

Cuando el autoclave no está en uso, la tapa debe permanecer apoyada sobre el cuerpo del autoclave.

Ventajas del calor húmedo:

- 1) Rápido calentamiento
- 2) Buena penetración
- 3) Corto tiempo de esterilización
- 4) Bajo deterioro del material expuesto (Por menor temperatura y menor tiempo)
- 5) No deja residuo tóxico
- 6) Económico.

Flameado

Pasar dos o tres veces por la llama del mechero de Bunsen varillas de vidrio, bocas de tubos, frascos y similares.

Las asas y otros utensilios metálicos se someten a la llama directa hasta calentarse al rojo.

Las pinzas se sumergen en alcohol y luego se secan a la llama.

Estos métodos son instantáneos y no mantienen la esterilidad en el tiempo.

Estufa de esterilización

El proceso de esterilización requiere mayor temperatura y tiempo que en el caso del vapor saturado, ya que tiene una menor capacidad de tomar, transportar y ceder el calor.

La temperatura de esterilización puede variar entre los 160 °C, 2 horas a 180 °C 1 hora.

El papel y el algodón no deben esterilizarse a más de 170 °C, ya que se carbonizan.

Normas de uso generales de la estufa

Los materiales no deben colocarse superpuestos ni tocando las paredes, de manera que no obstruya la circulación del aire.

- 1) Cargar la estufa de forma tal de no impedir la convección del aire y que el material no toque las paredes.
- 2) Controlar la posición del termómetro: su tubo no debe tocar la carcasa metálica ni la puerta, pues se podrían registrar temperaturas falsas (mayores a las reales).
- 3) Encender la fuente de energía
- 4) Cuando se alcanza la temperatura deseada comenzar a contar el tiempo de esterilización.
- 5) Dejar enfriar antes de retirar el material.

4- Responda el siguiente cuestionario

1. ¿Pasteurización es sinónimo de esterilización? Diga en qué casos se aplica la Pasteurización. Fundamente la respuesta.
2. Defina Tindalización.
3. Por qué es necesario purgar el aire de la cámara del autoclave. Relacione con la Ley de Dalton de las Presiones Parciales.
4. ¿Cómo se realiza el control del proceso de esterilización?
5. Compare los métodos de esterilización por calor seco (estufa) y por calor húmedo (autoclave) teniendo en cuenta: mecanismo de acción, tiempo, temperatura y tipo de material a tratar.
6. ¿Que características presentan las membranas utilizables para el proceso de filtración esterilizante?
7. ¿Qué método de esterilización se recomienda para materiales termolábiles? Cite ejemplos
8. ¿Cómo actúa el óxido de etileno?

ANEXO TEORICO

Controles del proceso de esterilización, indicadores biológicos

Para efectuar los **controles del proceso de esterilización**, se puede recurrir a 3 tipos de indicadores: físicos, químicos y biológicos. Los **indicadores biológicos** son preparaciones estandarizadas de microorganismos específicos, resistentes a un proceso determinado de esterilización. Se usan para demostrar que se han cumplido las condiciones del proceso de esterilización.

Los **microorganismos adecuados** para ser utilizados como indicadores biológicos, son endosporas bacterianas, ya que son intrínsecamente más resistentes que los microorganismos que usualmente contaminan los elementos a esterilizar.

Además, los indicadores deben contener un elevado número de endosporas. De esta manera, los Indicadores Biológicos presentan al proceso de esterilización un desafío mayor que la carga microbiana habitual (biocarga) presente en los productos a esterilizar. Cuando son procesados junto con el material a esterilizar permiten inferir la esterilidad del material procesado. El número de indicadores que deben ser utilizados y su ubicación depende de las dimensiones de los esterilizadores y de la cantidad y tamaño de los materiales a esterilizar.

Existen distintos **tipos y presentaciones de indicadores biológicos**. Cada tipo de indicador contiene una especie de microorganismos de resistencia conocida.

Algunos indicadores biológicos pueden contener 2 especies.

- Una forma de presentación de los indicadores biológicos es como endosporas colocadas en un soporte (discos o tiras de papel de filtro, vidrio, plástico u otros materiales), con un envoltorio que mantiene la integridad y viabilidad de las esporas. Los soportes y el envoltorio primario no deben afectar la estabilidad del indicador biológico, ni deben ser degradados por el proceso de esterilización. Una vez finalizado el proceso de esterilización, la tira o el disco con las endosporas debe ser colocado, en forma aséptica, en el medio de cultivo adecuado (que permita el desarrollo de los microorganismos) y posteriormente incubado a la temperatura adecuada.

- Otra forma de presentación son los indicadores autocontenidos que incluyen, además del soporte con las endosporas, una ampolla de vidrio cerrada con medio de cultivo estéril, capaz de favorecer el desarrollo de los microorganismos eventualmente sobrevivientes luego de ser sometidos al proceso de esterilización. El envase debe estar diseñado de modo tal que el agente esterilizante pueda penetrarlo. Después de la esterilización se debe romper la ampolla que contiene el medio de cultivo de modo tal que el medio impregne el soporte con las endosporas. El sistema entero debe ser incubado a la temperatura adecuada.

- También existen en el mercado, ampollas de vidrio con suspensiones de endosporas en medio de cultivo.

En todos los casos, el desarrollo microbiano se determina visualmente por cambio de color de un indicador de pH presente en el medio de cultivo o por observación de turbidez.

Si las condiciones del proceso se han cumplido, no debería observarse desarrollo microbiano. Por lo tanto, un resultado positivo (crecimiento) debe interpretarse como que no se han cumplido las condiciones del proceso y, en consecuencia, el material no está esterilizado.

Indicadores biológicos utilizados en esterilización por calor

Los indicadores biológicos para la **esterilización por calor seco** están constituidos por soportes de papel conteniendo endosporas de *Bacillus atrophaeus*, ATCC N°9372 (ex *Bacillus subtilis* var *niger*), altamente resistente a ese proceso de esterilización. Los soportes con las endosporas se incluyen en el ciclo de esterilización y una vez concluido éste se ponen en contacto con el medio de cultivo adecuado y se incuban a 37°C durante no menos de 7 días.

Los indicadores biológicos para el proceso de **esterilización por calor húmedo a presión superior a la normal** están constituidos por soportes de papel conteniendo endosporas de *Geobacillus stearothermophilus*, ATCC N° 7953 (ex *Bacillus stearothermophilus*), altamente resistente a ese proceso de esterilización.

Los soportes se incluyen en el ciclo de esterilización y una vez concluido éste se ponen en contacto con el medio de cultivo adecuado y se incuban a 56°C durante no menos de 7 días.

Indicadores biológicos para otros métodos de esterilización.

Para controlar la esterilización por **Oxido de etileno**, también se utilizan endosporas de *Bacillus atrophaeus* (ex *Bacillus subtilis* var *niger*) y para la esterilización por **radiaciones ionizantes**, endosporas de *Bacillus pumilus* ATCC N° 27142