

“MANUAL DE INTRODUCCIÓN AL CONTROL DE
CALIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

293940
MARÍA DEL ROCÍO ALVAREZ JUÁREZ

DIRECTOR DE TESIS
M. en C. ANGÉLICA CALDERÓN VILLAGÓMEZ

México, D. F. Julio de ~~2000~~

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis Padres : Porque gracias a ustedes soy una profesionista.

A mi Hermano Rolando: Porque hiciste mucho para financiar mi carrera.

A mi Esposo Salomón: Por tu apoyo y gran amor.

INDICE

Pág.

I.- <u>INTRODUCCION</u>	1
1.1 Marco Teórico	
1.1.1 Qué es Control de Calidad	
1.1.2 Qué es Control de Calidad en Microbiología	
1.2 Planteamiento del Problema	
1.3 Justificación	
1.4 Objetivos	
1.4.1 General	
1.4.2 Específicos	
II.- <u>AGUA</u>	7
2.1 Propiedades Físicas y Químicas	
2.2 Características Microbiológicas	
2.3 Control de Calidad del Agua	
III.- <u>VALIDACION</u>	13
3.1 Qué es Validación	
3.2 Enfoque Básico	
3.3 Principios Generales	
3.4 Definiciones	
3.4.1 Validación de Procesos	
3.4.2 Calificación de la Instalación	
3.4.3 Calificación de los Rendimientos de Proceso	
3.4.4 Calificación Operacional	
3.4.5 Validación Retrospectiva	
3.5 Protocolo de Validación	
3.5.1 El peor caso	

- 3.6 Validación de Comprobación
- 3.7 Conceptos Generales
- 3.8 Elementos de la Validación de Procesos
 - 3.8.1 Validación Prospectiva
 - 3.8.2 Equipo y Proceso
- 3.9 Sistema para Garantizar una Oportuna Revalidación
- 3.10 Documentación
- 3.11 Calibración

IV.-EQUIPO EN UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA25

- 4.1 Autoclaves
- 4.2 Hornos
- 4.3 Refrigeradores
- 4.4 Potenciometros
- 4.5 Incubadoras
- 4.6 Campanas de Flujo Laminar
 - 4.6.1 Horizontales
 - 4.6.2 Verticales
 - 4.6.3 Cãmpanas de Seguridad Biológica Tipo III
- 4.7 Microscopio
- 4.8 Cámara de Neubauer

DEFINIENDO: USO, FIGURA, FUNCIONAMIENTO, FUNDAMENTO Y VALIDACION

V.-SANITIZANTES 66

- 5.1 Agentes Químicos
- 5.2 Agentes Físicos

DEFINIENDO: EFICACIA, COMPROBACION DE DESACTIVACION PARA SU USO.

VI.-ESTERIZACION 75

6.1 Fundamento

6.2 Técnicas y/o Tipos

6.3 Métodos Físicos

6.3.1 Calor Húmedo

DEFINIENDO: TIEMPOS DE EXPOSICION, VALIDACION DEL METODO.

VII.-MEDIOS DE CULTIVO 111

7.1 Definición

7.2 Clasificación

7.2.1 Microorganismos

7.2.2 Medios Sólidos

7.2.3 Medios Semisólidos

7.2.4 Medios Líquidos

7.2.5 Medios Sintéticos

7.2.6 Medios No Sintéticos

7.2.7 Medios Enriquecidos

7.3 Preparación y Almacenamiento

7.4 Promoción de Crecimiento

7.5 Validación

VIII.-SEGURIDAD EN EL LABORATORIO 135

8.1 Reglas Básicas de Seguridad e Higiene

8.2 Vestimenta, Equipo y Comportamiento

8.3 Limpieza y Salud

8.4 Identificaciones y Letreros

8.5 Documentación

8.6 ¿Qué hacer y que no hacer en caso de un Accidente?

IX.-CONCLUSIONES 140

X.-SUGERENCIAS 142

XI.-BIBLIOGRAFIA 143

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 MARCO TEORICO

El control de calidad es un proceso de regulación donde se puede medir la calidad real, comparándola con normas y actuar sobre la diferencia, proporcionando un producto o un servicio en el cual su calidad esta siendo diseñada, producida y conservada a un costo económico y que además satisface por entero al consumidor.

El control de calidad ha de incidir en todo proceso productivo desde el momento que se planifica el producto o servicio, el control de materias primas, proceso de fabricación hasta el producto y/o resultados de análisis, etc.

1.1.1 QUE ES CONTROL DE CALIDAD

La calidad es la totalidad de características y rasgos de un producto o servicio que cuenta con la capacidad de satisfacer una necesidad y cubrir los requisitos de un cliente.

La totalidad de características y rasgos determina el tipo, clase o categoría del producto, por tanto, es necesario cubrir desde un principio, paso a paso, la fabricación y/o manufactura por la cual atraviesan los productos o servicios para alcanzar esta calidad y mantenerla bajo control.

1.1.2 CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA

De acuerdo a lo anterior, podemos definir el Control de Calidad en un laboratorio microbiológico, o bien un control de calidad en microbiología; es la periódica inspección y documentación del correcto funcionamiento del equipo, la seguridad del área de trabajo, de la capacidad del personal, de la toma, aislamiento, tratamiento y conservación de muestras, reactivos y medios de cultivo así como su validación.

Dentro de este control de calidad deben existir requerimientos de operación para establecer un buen sistema de calidad:

A.- Los procedimientos de trabajo deben estar por escrito:

- 1) Procedimientos de almacenamiento.
- 2) Procedimientos de despacho o uso.
- 3) Procedimiento de disposición final.
- 4) Procedimiento de identificación.

B.- Las áreas, instalaciones y equipo serán adecuadas.

C.- Se contará con especificaciones de reactivos y medios de cultivo por escrito.

D.- Habrá un registro donde se controlen resultados, los cuales deben ser claros, legibles y archivados adecuadamente para su fácil acceso.

E.- Características de un laboratorio microbiológico.

Dentro de un laboratorio de microbiología y de acuerdo a su capacidad y diversidad de trabajo debe contar con los espacios necesarios para su adecuado funcionamiento.

Un laboratorio debe reunir características tales como: diseño, construcción, iluminación, ventilación, limpieza y orden definidas y específicas.

Haciendo un resumen de estas; decimos que los locales se diseñarán y construirán de acuerdo al tipo de operación destinada, de tal modo que se facilite su limpieza y mantenimiento, se conserven las condiciones generales apropiadas y se evite cualquier contaminación ambiental, caracterizándose éste por:

1.- Pisos, muros y techos del área, lisos, contruidos de materiales que no desprendan polvo, que sean impermeables y sin grietas y en las áreas estériles las uniones serán redondeadas.

2.- Debe existir una área específica para cada etapa de trabajo, por ejemplo: área de pesada, área de preparación, área de siembra, etc., con separación física.

3.- La iluminación y ventilación deben ser efectivas y en algunos casos se contará con controles de aire, polvos, humedad y temperatura.

4.- Los laboratorios deben conservar una limpieza y un orden de acuerdo a un programa especificado por escrito.

5.- Es importante contar con el mobiliario más adecuado para proporcionar funcionalidad y eficacia al trabajo a desempeñar en el laboratorio, éstos tendrán la distribución y espacio para la adecuada conexión a las redes de servicios como es la electricidad, el gas, agua, vacío, etc.

Dentro de las características importantes de un laboratorio también se deben mencionar las tuberías, cañerías, el mantenimiento y conservación de éste.

I) Las tuberías y cañerías fijas serán adecuadamente identificadas con respecto al material que conducen con letreros o códigos de colores, tales tuberías o cañerías, deben estar construidas con materiales adecuados para proteger el fluido que conduzcan (es decir, que no reaccione con éstas).

II) Los drenajes serán de tamaño adecuado y si están conectados directamente a una coladera o alcantarilla, habrá una salida de aire, una trampa o algún dispositivo mecánico que evite el sifoneo.

III) Dentro del mantenimiento del laboratorio deben de recolectarse las aguas negras, basura y otros desperdicios como : medios de cultivo con o sin uso, material de siembra desechable, etc., con el fin de desactivar cualquier cepa microbiana y/o neutralizar los reactivos corrosivos para evitar la contaminación del medio ambiente.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha observado que los programas de estudio de microbiología son muy extensos y que se deben cubrir en un periodo de tiempo que no alcanza o que por cubrir este programa algunos conceptos queden en un estudiante ambiguos o inconclusos, por tal razón, el contar con un manual que contenga las bases y conceptos que en muchas ocasiones no se encuentran en una sola bibliografía apoyará al estudiante, principalmente a disminuir el tiempo de investigación de estos conceptos, que además ayudarán a la introducción del conocimiento de su área de trabajo, al control de calidad y seguridad en un laboratorio de microbiología.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Contar con un manual donde se integran las normas, reglas, buenas practicas de manufactura, seguridad y tratamiento de desechos que ocasionan contaminación ambiental para el buen funcionamiento de un laboratorio microbiológico.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 GENERAL

Que por medio de recopilar la información bibliográfica más actual de todos y cada uno de los pasos que se deban seguir en un Laboratorio de Microbiología se alcance un Control de Calidad Total.

1.4.2 ESPECIFICOS

Que en un sólo manual se concentre la mayor información posible, clara y precisa para obtener un Control de Calidad en el Laboratorio de Microbiología.

Que el contenido de este trabajo sea de fácil comprensión para que a su vez pueda ser aplicado en las actividades que en un laboratorio de microbiología se realizan a nivel enseñanza para nuevos alumnos en esta área, e inducirlos a llevar un control de calidad en cualquier trabajo de cualquier área para su mejor formación.

Que se integren a los conocimientos de microbiología conceptos tales como: Validación de Equipo, Validación de Medios de Cultivo (antes y después de su uso), Validación de Cepas microbianas, Control de calidad Total, entre otros.

CITAS TEXTUALES

- 15.-FEIGENBAUM, V., Control Total de la Calidad, Pittsfield Massachusetts, Compañía Editorial Continental S.A., México, 1987 3ª Edición, pág. 34 – 39

- 22.-HERNÁNDEZ, Aragón Ma. Tereza. Tesis : Establecimiento de un Sistema de Control de Calidad en el Laboratorio de Microbiología Clínica UNAM, México, 1984 pág. 81

- 37.-TOBELLA, Sabater Juan, Antonio Vilunara Torrallordona, Buenas Practicas de Laboratorio (GLP), Madrid España 1988, Edit. Días de Santos S.A. pág. 25 -59

CAPITULO II

AGUA

2.1 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

La mayor parte de los elementos se encuentran en la materia viva como compuestos químicos, y no como elementos libres. Un compuesto químico es una sustancia formada por dos o más clases diferentes de átomos o iones juntos; por tanto pueden descomponerse o separarse en dos o más sustancias más sencillas.

Las cantidades de los elementos de un compuesto dado están siempre presentes en una proporción definida por peso. Esto refleja el hecho de que los átomos se unen por enlaces químicos con precisión y forman el compuesto. La unión de átomos por enlaces químicos se llama molécula. Una molécula es la menor partícula de un compuesto que posee la composición y las propiedades de una porción más grande de él. Una molécula está formada por dos o más átomos que pueden ser iguales, como en una molécula de oxígeno (O_2), o pueden ser átomos de diferentes elementos.

Las propiedades de un compuesto químico suelen ser muy diferentes de las propiedades de sus elementos constitutivos. Por ejemplo cada molécula de agua contiene dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno, y las propiedades químicas del agua son muy diferentes de las del hidrógeno o del oxígeno. En forma química se expresa con su fórmula H_2O . Esta fórmula química da en símbolos las variedades de átomos que tiene la molécula y su proporción relativa.

La mayor parte de la célula es agua. En el hombre los porcentajes de agua en los distintos tejidos varía del 20 % aproximadamente en el hueso, hasta el 85 % en las células nerviosas.

Al rededor de dos tercios del peso total de nuestro organismo es agua. El agua cumple con un buen número de funciones en los sistemas vivos, casi todas las sustancias químicas se encuentran disueltas en ella y es necesario un medio acuoso para que puedan tener lugar las reacciones químicas. El agua disuelve los productos de desecho del metabolismo y sirve para eliminarlos.

Tiene además una gran capacidad calorífica; en otras palabras puede absorber mucho calor sin apenas cambiar su temperatura. Esto se debe a que las moléculas del agua (hielo o agua líquida) se encuentran unidas por enlaces de hidrogeno y parte de la energía calorífica se gasta en romper dichos enlaces. El agua protege así la materia viva contra cambios bruscos de temperatura. El agua tiene la capacidad de absorber gran cantidad de calor al pasar del estado líquido al gaseoso, lo que permite al cuerpo disipar el exceso de calor por evaporación. El calor de vaporización del agua es de 574 Kcal/Kg.

El agua tiene por ser un compuesto puro, cuyos componentes siempre están en proporción fija, la gran capacidad de formar mezclas que se forman por dos o más variedades de átomos o moléculas que pueden combinarse en proporciones variables.

El peso molecular de un compuesto es la suma de los pesos atómicos de sus átomos constituyentes. Así el peso molecular del agua es:

$$\text{Peso atómico del hidrogeno} = 1 \times 2 = 2$$

$$\text{Peso atómico del oxígeno} = 16 \times 1 = 16$$

$$\text{Peso molecular H}_2\text{O} = 18$$

En una propiedad más encontramos el grado de acidez o alcalinidad de un líquido, o sea su concentración de iones hidrogeno, en términos de pH, logaritmo negativo de dicha concentración.

La mayor parte de las células animales o vegetales no son ni muy ácidas ni muy alcalinas, sino que contienen una mezcla casi neutra de sustancias ácidas o alcalinas. La concentración de iones de hidrógeno de tal solución, o de agua pura, es de 10^{-7} molar, y así su pH es 7.0 . En pH 7.0 las concentraciones de iones H^+ y de iones OH^- libres son exactamente iguales. Cualquier variación grande de pH de una célula es incompatible con la vida. Puesto que la escala empleada es logarítmica, una solución con pH 6.0 tiene 10 veces más iones hidrógeno que una de pH 7.0. Cuando se mezcla un ácido y una base, el ion hidrógeno del ácido se une al hidroxilo de la base para formar una molécula de agua. El resto del ácido se combina con el resto de la base para formar una sal.

Haciendo un resumen de estas propiedades podemos señalar entonces: que es un líquido, transparente, insípido, inodoro, incoloro, con punto de congelación $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y punto de ebullición $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una presión de 760 mm Hg; prácticamente incompresible, con calor específico alto, poderosa capacidad solvente y funciona como dipolo. Existe libre en la naturaleza en los tres estados físicos y constituye al rededor de 70% del peso corporal humano en donde tiene importante papel en la regulación térmica.

2.2 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Por las características físicas y químicas tan peculiares que presenta el agua, se le encuentra formando parte de una gran variedad de materiales en la naturaleza, y su insustituible participación en los procesos biológicos obedece a las características suigeneris que posee .

Debido a que el agua es clasificada en varios tipos en un laboratorio microbiológico podemos trabajar con Agua Purificada; que puede poseer diferentes tipos de carga microbiológica dependiendo de su método de obtención, distribución y/o almacenamiento. La carga microbiana aeróbica máxima admisible en los puntos de uso del agua. Uso Farmacéutico es de 500 unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 ml, mientras que la de agua purificada es de 800 UFC por 100 ml y la de agua para fabricación de inyectables es de 50 UFC por 100 ml. Y que en todos estos casos no debe haber la presencia de microorganismos patógenos.

Algunas cargas microbianas en algunos tipos de agua.

TABLA 1

Tipo	Carga Microbiana
Agua Purificada	No más de 800 UFC/100ml (mesófilos aerobios no patógenos)
Agua para la fábrica ción de inyectables	No más de 50 FUC/100ml (mesófiolos aerobios no patógenos)
Agua Bacteriostática para inyectables	Pasa la prueba de esterilidad (MGA.0381)

2.3 CONTROL DE CALIDAD DEL AGUA

El conjunto de cualidades del agua a llevado a darle una gran lista de usos, entre la más sencilla a la mas complicada, por ejemplo:

- a) Bebida, culinaria, higiene personal, riego, aseo de utensilios, lavado de alimentos, retiro de desechos domésticos e industriales. etc.

b) Saneamiento de locales, calles y edificios, generador de vapor y de electricidad, solvente y materia prima en la industria, instalaciones de aire acondicionado, enfriamiento y muchos más.

Es fácil apreciar que en los usos en donde se involucra un riesgo para la salud surgen hechos tales como:

- 1.- Cuando el agua se pone en contacto directo con sustancias tóxicas y microorganismos patógenos.
- 2.- Como resultado, estos agentes se incorporan al agua disueltos o en suspensión.
- 3.- El contacto ocurre espontáneamente en la naturaleza o como consecuencia del uso que hacemos del agua (lo que es prácticamente inevitable).
- 4.- Al hacer uso del agua, ésta se pone en contacto directo con el cuerpo humano, externa e internamente.

Por otra parte, reconociendo que la necesidad de consumo del agua es de tal magnitud que su disposición constituye una prioridad, el Control de su Calidad sanitaria se justifica plenamente por que:

- a) Puede contener una gran variedad de agentes patógenos.
- b) Se tiene conocimiento de casos aislados y epidemias, que se presentan, usando el agua como vehículo del agente patógeno.
- c) La incidencia de los casos mencionados es mínima cuando el control sanitario de su calidad se ejerce sistemáticamente en una comunidad.

Desde el punto de vista bacteriológico, la importancia sanitaria se refiere a la presencia de aquellos microorganismos patógenos que pueden utilizar el agua como vehículo de diseminación, principalmente bacterias intestinales, siendo utilizada como medio de eliminación de excretas y otros desechos; puede también contener microorganismos patógenos de asiento no intestinal (flora de la piel por ejemplo), tales gérmenes son destruidos por los mismos mecanismos y medios que suelen utilizar cuando se tratan las aguas por el proceso ordinario de potabilización.

Por esta razón, el problema de control sanitario del agua se realiza en función de las bacterias intestinales.

Considerando la importancia que representa el Control de Calidad del agua existen métodos de validación que nos auxilian a confiar en el agua de uso en un laboratorio microbiológico en la industria farmacéutica, cosmética, alimenticia etc. dependiendo el tipo de agua que estas utilicen. Por ejemplo:

Determinación de sustancias inhibitorias o promotoras del crecimiento microbiano en el agua destilada o desmineralizada, Subcomite de Microbiología del Comité de redacción de Guías de Validación de la SS. Donde su Objetivo es demostrar la ausencia de sustancias inhibitorias o promotoras del crecimiento en el agua, que emplea un laboratorio de microbiología (de la industria químico farmacéutica).

Su alcance es que la prueba se aplique anualmente a aguas destiladas o demineralizadas que se emplean para preparar medios de cultivo, diluyentes y reactivos para análisis microbiano y siempre que estas aguas provengan de sistemas de purificación recién instalados o sujetos a modificaciones que puedan alterar la calidad del agua.

CITAS TEXTUALES

14.-FARMACOPEA de los Estados Unidos Mexicanos Quinta Edición México 198, pág. 477, 201,

20.- GUÍA Oficial de Validación de la S.S.A. "Filtros Asépticos y Sistemas de Generación de Agua Calidad Inyectable" México 1991 pág. 3 - 12

26.- KEMMER N. Frank and Jonh McCallion, Manual del Agua. Su Naturaleza, Tratamiento y Aplicaciones, Nalco Chemical Company, Editorial McGraw-Hill, Tomo I México 1993

CAPITULO III

III.- VALIDACIÓN

3.1 QUÉ ES VALIDACIÓN

La más reciente definición citada en los lineamientos de validación específica (Mayo 1987), nos dice que validación es reunir evidencia documental que ofrezca un alto grado de certidumbre de que un proceso específico producirá consistentemente producto o servicio que cumple y/o satisfaga sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados.

C.G. Broker de la FDA definió "la validación es la comprobación (o al menos ciertos grados de certidumbre) de que un sistema particular producirá un resultado de alta calidad una y otra vez, suponiendo que el procedimiento y los factores en particular no cambien y sean adecuadamente controlados.

La validación también ha sido descrita como una metodología para demostrar que un sistema o proceso está bajo control en todo momento.

3.2 ENFOQUE BÁSICO

Mencionando los pasos más importantes:

A) Se determinarán los atributos deseados del producto; por ejemplo sus características físicas y de rendimiento.

B) Una vez establecidos los atributos y para garantizar que reflejan con precisión a estos, se establecen (del producto) criterios de aceptación.

C) Para satisfacer estas especificaciones, se selecciona el proceso, el equipo y el personal adecuados.

D) Se establece un Sistema de Control de Calidad que vigile los procesos, el equipo y el personal de tal manera que se pueda identificar cualquier cambio involucrado.

E) Deben existir procedimientos escritos para tal control, diseñados para garantizar la identidad, potencia, calidad y/o pureza del proceso o servicio.

En este punto se divide la validación en dos partes. Es importante destacar que estas dos partes abarcan una enorme cantidad de diferentes pruebas de rendimiento, análisis y consideraciones; por tanto son demasiado amplias, con base a esto solo mencionaremos: la metodología, la preparación académica, la capacidad de las personas involucradas en la validación:

a) Los estudios de calificación de la instalación proporcionan confianza en que el equipo de procesamiento es capaz de operar consistentemente en los límites y tolerancias establecidos.

b) La calificación del rendimiento consiste en pruebas rigurosas para demostrar la efectividad del proceso y del equipo de procesamiento. Cada proceso deberá definirse de manera suficiente, específica y cada paso del proceso deberá ponerse a prueba para determinar su idoneidad.

3.3 LINEAMIENTOS SOBRE LOS PRINCIPIOS GENERALES DE VALIDACIÓN

En 1987 la FDA, publicó la edición final de los "lineamientos sobre los principios generales de la validación" y aunque la aplicación final de estos depende de la interpretación individual que hagan los laboratorios, escuelas y/o compañías etc., respecto a la manera en que pretenden validar sus instalaciones.

3.4 DEFINICIONES

3.4.1 VALIDACIÓN DE PROCESOS

Es la recopilación de evidencia documental que proporciona un alto grado de certidumbre de que un proceso específico permitirá realizar consistentemente, un producto o servicio que cumpla las especificaciones y atributos de calidad establecidos. (Esta definición concierne al “marco de validación completo”).

3.4.2 CALIFICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

Parte de la validación de procesos. Reafirmación de la confianza en que el equipo de procesamiento y los sistemas auxiliares son capaces de operar consistentemente dentro de los límites y tolerancias específicas.

3.4.3 CALIFICACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS DE LOS PROCESOS

Parte de la validación de procesos. Reafirmación de la confianza en que el proceso es efectivo y reproducible.

3.4.4 CALIFICACIÓN OPERACIONAL

Parte de la validación de procesos. Verificación de que el equipo se puede operar como se espera, y de que es capaz de operarse satisfactoriamente sobre toda la gama de presiones, temperaturas, tiempos y otros parámetros operacionales.

3.4.5 VALIDACIÓN RETROSPECTIVA

Validación de un proceso para un producto que ya se está distribuyendo en base a la producción acumulada, en las pruebas y en los datos de control obtenidos.

La FDA agregó la validación retrospectiva a los lineamientos, principalmente para su uso en las siguientes áreas:

- Medicamentos Orales.
- Medicamentos de uso externo.
- Dispositivos Médicos.
- Diagnósticos en análisis clínicos.
- Otros.

De tal manera el uso de la validación retrospectiva está limitado.

3.5 PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

Plan escrito donde se especifica la manera de conducir la validación, incluyendo parámetros de pruebas, características del producto, equipo de producción y puntos de decisión a cerca de lo que se entiende por resultados de prueba aceptables.

3.5.1 EL PEOR CASO

El conjunto de condiciones que abarca límites superiores e inferiores de procesamientos y circunstancias, incluyendo las que se encuentran dentro de los procedimientos estándar de la operación, los cuales llevan una mayor probabilidad de falla del proceso o del producto. Tales condiciones no necesariamente inducen a fallas en el producto o proceso.

3.6. VALIDACIÓN DE COMPROBACIÓN

La realización de pruebas para determinar los límites de capacidad de un equipo o sistema, las cuales forman parte de un proceso de manufactura. El término límites de capacidad no significa comprobación destructiva, pero se tiene que determinar dentro de los cuales se pueda garantizar el nivel preestablecido de calidad.

3.7 CONCEPTOS GENERALES

La comprobación de la calidad del producto o servicio proviene de una cuidadosa atención a diversos factores, incluyendo la selección de partes y materiales para la determinación de la calidad el diseño adecuado de productos y procesos, control del proceso y del producto final.

Los principios básicos de la comprobación de calidad tiene como meta la producción de artículos o servicios aptos para el uso al que están diseñados. Estos principios pueden expresarse como sigue: la calidad, la seguridad y efectividad deben ser diseñadas como parte del producto o servicio e incorporarse a él; la calidad no puede inspeccionar ni verificar en los productos terminados, y cada paso de manufactura debe ser controlado para maximizar la probabilidad de que el producto terminado satisfaga todas las especificaciones de calidad y diseño. La validación de procesos es un elemento vital para garantizar que se cumplan las metas de comprobación en la calidad.

Es a través de un cuidadoso diseño y de la validación tanto del proceso como de los controles del proceso que un fabricante, un analista, o un estudiante puede adquirir un alto grado de confianza en que todas las unidades realizadas de lotes, análisis o estudios sucesivos serán aceptables. La validación exitosa de un proceso puede reducir la dependencia en las pruebas intensivas de los productos en proceso y terminado.

Debemos observar que en todos o en casi todos los casos, las pruebas del producto final desempeñan un papel importante en la verificación de que las metas de comprobación y las pruebas del producto final no son excluyentes.

Es importante que el fabricante, analista o estudiante, redacte un protocolo de validación donde se especifiquen los procedimientos y pruebas que se utilizarán y los datos que se recopilan.

El propósito con el cual se recopilarán datos es para quedar claro en los siguientes puntos:

- Los datos deben reflejar hechos, y se deben recopilar de manera cuidadosa y precisa.
- El protocolo debe especificar un número suficiente de pruebas respectivas del proceso para demostrar su reproducción sucesiva.
- Las condiciones de prueba deberán abarcar los límites del procedimiento.
- La documentación deberá incluir evidencia de la conveniencia de los materiales, así como del rendimiento y confiabilidad del equipo y los sistemas.
- Se determinan los controles del equipo y del proceso para garantizar o no que las especificaciones del producto son satisfactorias.

Los datos de las pruebas de productos pueden ser valiosos en el proceso de validación, particularmente en las situaciones donde los atributos y las variabilidades de calidad se puedan medir fácilmente.

3.8 ELEMENTOS DE LA VALIDACIÓN DE PROCESOS

3.8.1 VALIDACIÓN PROSPECTIVA

La validación prospectiva se presenta cuando hay un cambio en el proceso de manufactura que pudiera afectar las características del producto, tales como uniformidad e identidad. Los siguientes elementos se consideran fundamentales en la validación prospectiva.

3.8.2 EQUIPO Y PROCESO

El equipo y el proceso se deberán diseñar y/o seleccionar de tal manera que las especificaciones de los productos se cumplan.

Equipo: Calificación de la Instalación.

Los estudios de calificación de la instalación proporcionan confianza en el equipo de procesamiento y los sistemas auxiliares son capaces de operar consistentemente dentro de los límites y tolerancias establecidos.

Una vez diseñado y seleccionado el equipo de procesamiento, deberá ser evaluado y puesto a prueba de operar satisfactoriamente dentro de los límites operativos que requiere el proceso. Esta fase de la validación incluye examinar el diseño del equipo; determinar los requerimientos de calibración, mantenimiento y ajuste e identificar las características críticas del equipo que podrían afectar el proceso y al producto. La información obtenida se usará para establecer procedimientos escritos que abarquen la calibración, el mantenimiento, la vigilancia y el control del equipo. Es importante que en la calificación del equipo se simulen las condiciones reales de la producción. Las pruebas y comprobaciones, se deberán repetir un número suficiente de veces para garantizar durante la prueba o comprobación.

Si alguna prueba o comprobación muestra que el equipo no funciona dentro de sus especificaciones, se debe efectuar una evaluación para identificar la causa de la falla. Se harán las correlaciones y se llevarán a cabo las pruebas que sean necesarias para verificar que el equipo funciona dentro de las especificaciones.

La variabilidad que se observe en el equipo entre las pruebas puede usarse como base para determinar el número total de ensayos que requieran los siguientes estudios sobre calificación del rendimiento del proceso.

La calificación de la instalación incluirá una revisión de los procedimientos pertinentes de mantenimiento, de las listas de refacciones y de los métodos de calibración para cada pieza del equipo. El objetivo es garantizar que todas las reparaciones se puedan realizar de tal manera que no afecten los requerimientos de adición, limpieza especial posterior a la reparación y calibración que se desarrollen para evitar la manufactura inadvertida de productos inadecuados.

La planeación durante la fase de calificación puede impedir que haya confusiones al realizarse las reparaciones de emergencia, las cuales podrían conducir a usar una refacción equivocada.

PROCESO: CALIFICACIÓN DEL RENDIMIENTO

La finalidad de la calificación del rendimiento consiste en efectuar pruebas rigurosas para demostrar la efectividad y reproducibilidad de un proceso. En esta fase se entiende que las especificaciones del proceso ya fueron establecidas y resultaron aceptables después de todas las pruebas pertinentes establecidas y que el equipo ya fue considerado aceptable con base en los estudios apropiados de instalación.

3.9 SISTEMAS PARA GARANTIZAR UNA OPORTUNA REVALIDACIÓN (O RECALIFICACIÓN) DEL PROCESO O EQUIPO

Deberá haber un sistema de comprobación de calidad en lugares que requieren revalidación debido a cambios en formulaciones, equipo o proceso, materias primas, proveedores de éstas, etc., que pueden afectar la efectividad o las características del producto o resultados finales de un análisis microbiológico según el caso. Si se determina que hay diferencias adversas en la materia prima, será necesario revalidar el proceso.

Una manera de detectar los cambios que requieren revalidación es usar pruebas y métodos que generalmente producen resultados que trascienden el criterio simple de aceptar o rechazar y que por el contrario permiten detectar variaciones en las especificaciones del producto o proceso y determinar si un proceso se está saliendo de control. Estas pruebas pueden basarse en el rendimiento del equipo, proceso y producto observado durante los estudios iniciales de comprobación de la validación.

El grado de la revalidación depende de la naturaleza de los cambios y de la manera en que afectan los diferentes aspectos de la producción que previamente se ha validado.

3.10 DOCUMENTACIÓN

Es necesario que el programa de validación sea documentado y que la documentación se actualice debidamente. La aprobación de un proceso y la autorización para usarlo deberá basarse en una revisión de toda la documentación de la validación, incluyendo los resultados de la calibración del equipo, de la calificación del rendimiento del proceso y de las pruebas del producto para garantizar la compatibilidad de dicho proceso. Es importante registrar adecuadamente los detalles del proceso por ejemplo; duración, temperatura y el equipo que se utilizó, etc.

Es importante hacer notar que todos los documentos deberán conservarse durante dos años después de la fecha de registro de alta del producto o servicio. Estos documentos deben incluir:

- Registro de validación
- Registro de Calibración
- Registro de Mantenimiento
- Registro de Reparaciones.

Estos documentos deben archivarlos de tal forma que su manejo sea práctico, bien identificado y en un lugar seguro.

3.11 CALIBRACIÓN

Antes de empezar la validación, es necesario calibrar todos los instrumentos que se utilizan. Además es necesaria la recalibración sistemática de dichos instrumentos. Un programa de Calibración consta de :

Paso I: Diseño de un sistema para la documentación de la calibración.

Paso II: Preparación de los procedimientos operativos estándar de calibración.

Paso III: Capacitación del personal encargado.

Paso IV: Prueba e implantación del programa de calibración.

PASO I

Los puntos principales de este paso son los siguientes:

- 1.- Sistema de numeración para identificar todos los instrumentos que necesitan calibración.
- 2.- Archivo del historial de los instrumentos. Cada instrumento tiene su propio archivo individual que consta de :
 - Hoja del historial
 - Todos los documentos que pertenezcan a este instrumento (como facturas, manuales de uso, etc.)
- 3.- Archivo recordatorio del calendario de recalibración. Especificando la fecha de la nueva revisión, este archivo esta diseñado para originar la inspección, revisión y si es necesario, la recalibración de cada instrumento.
- 4.- Certificado de Calibración. Este se extiende cada vez que se revisa o calibra un instrumento. Los certificados de calibración contienen:
 - a.- Formulario numerado progresivamente.
 - b.- Identificación del instrumento.
 - c.- Nombre del instrumento y descripción completa
 - d.- Lista del equipo de prueba usado en la calibración
 - e.- Lecturas del standard rastreable.
 - f.- Lecturas del instrumento revisado

g.- Lecturas después de los ajustes al estándar y al instrumento

h.- Registro de los ajustes realizados.

5.- Etiquetas de calibración. Estas etiquetas nos sugieren una clasificación de los instrumentos además de adherir esta identificación a cada instrumento.

Crítico (calibrar instrumentos 3 ó 4 veces por año)

No Crítico (calibrar instrumentos una vez por año)

Fuera de Servicio.

PASO II

Para mantener calibrados todos los instrumentos es necesario tener a la mano los manuales de procedimiento de operación, descripción del equipo y todas las referencias de estos.

PASO III

El éxito del programa de calibración, es que sea administrado por el Departamento de Meteorología (Validación) del Departamento de Control de Calidad. El personal calificado puede garantizar que todos los instrumentos y equipos que requieren calibración serán recalibrados, en realidad, a intervalos regulares de manera ordenada y oportuna, y que quedara debidamente documentado para satisfacer los programas de cumplimientos de reglamentos y criterios de comprobación de calidad.

PASO IV.

En este punto se pone en operación el sistema. Los aspectos sobresalientes del seguimiento de la operación son :

1.- Calibración de los instrumentos contra estándares conocidos.

2.- Documentación de la calibración real.

3.- Aplicación de una etiqueta de calibración al instrumento.

4.- Registro de la información exacta para formar un archivo que tenga el historial de cada pieza del equipo o instrumento.

Podemos concluir entonces que el Programa de Calibración es una necesidad.

Para poder concluir debemos mencionar que: “Los lineamientos para la validación de procesos especifican con bastante claridad que una parte del proceso de validación consiste en demostrar que cuando varios sistemas trabajan juntos realmente logran el efecto buscado”.

CITAS TEXTUALES

10.-COURIEL, David Benito José de Jesús Alvarado, Validación de Procesos Farmacéuticos, Asociación Farmacéutica Mexicana, México, 1982 pág. 78

12.-DENER an Braird. Ellis Horwood, Guide to Microbiological Control in Pharmaceutical Series in Pharmaceutical Tecnology School of Health Sciences, Liverpool Polytenic 1992, pág. 182 - 213, 220 –240

33.-REVISTA Mexicana de las Ciencias Validation: fundation of GMP Pharmaceutical Engiening, Vol. 10 No. 3 Pág. 44, May- Jun 1996

34.-RUÍZ Avilés David Q.B.P. CORTEZ Gómez Alicia I.B.Q.,Manuales de Laboratorio Instituto Politécnico Nacional,Escuela Nacional de Ciencias,México 1ª Edición 1983

CAPITULO IV

EQUIPO EN UN LABORATORIO MICROBIOLÓGICO

Todo el equipo utilizado en el laboratorio microbiológico debe reunir ciertas características, las cuales nos indican: su función, su manejo, limpieza, localización en el laboratorio, mantenimiento, validación y construcción. En cuanto a esta última el equipo será diseñado y construido con materiales cuyas partes destinadas a entrar en contacto con el producto no altere la seguridad, identidad, concentración, pureza y sobre todo calidad del mismo. Además estará diseñado de manera que sea confiable la seguridad de los operarios.

Para el mantenimiento del equipo en el laboratorio deben existir procedimientos escritos para prevenir cualquier mal funcionamiento o contaminación, registrando todas estas operaciones.

La localización del equipo reúne ciertas características tales como:

- No obstaculizar movimientos al analista.
- Deben estar ordenados e identificados.
- Que estén físicamente separados.

En cuanto al manejo del equipo, es importante que exista un esquema del mismo, indicando como se llaman cada una de sus partes, e indicar paso a paso su manejo; también es importante que existan por escrito las condiciones de uso, es decir, límites de temperatura, presión, etc.

4.1 AUTOCLAVES

Es una cámara de presión que se usa para esterilizar utensilios, material de laboratorio, medios de cultivo, cepas microbianas, etc.

La esterilización en un autoclave esta basada en la transferencia de calor con vapor de saturación en la carga del autoclave, en algunos casos se combina con un efecto de hidratación causada por la condensación formada durante el proceso. La transferencia de calor es máxima si el vapor es mantenido a través de la fase de separación agua-vapor donde en alguno de los puntos de la cámara del autoclave emerge la esterilización demostrada o registrada por sensores térmicos (o termopares), o dispositivos de resistencia de temperatura.

Una autoclave es un recipiente para presión y debe ser considerado potencialmente peligroso. Cuando el aire ha sido expulsado y la cámara se ha llenado con vapor saturado, existe una relación entre la temperatura y la presión; si existe aire, la temperatura será menor que la correspondiente a la presión de vapor.

El exceso de vapor es perjudicial para la mayoría de los medios de cultivo, pero el tratamiento en el autoclave es el método más satisfactorio de esterilizar material o medios de cultivo que soporten temperaturas superiores a los 100°C, las combinaciones rutinarias de temperatura son 115 °C (10 lb) por 20 minutos. La temperatura del interior de la autoclave después del proceso de esterilización debe descender a 90 °C o menos antes de abrirla para sacar el contenido.

TABLA 2

TEMPERATURA	EXCESO DE PRESIÓN POR ARRIBA DE LA	
	ATMOSFERA	
° C	Kg. / cm ²	Lb / Plg ²
100	0	0
105	0.20	2.8
110	0.43	6.1
115	0.69	9.8
115.5	0.72	10.2
120	0.99	14.1
121	1.06	15.0

Existen varios tipos de autoclaves los cuales sólo mencionamos algunos:

- 1) De una o dos cámaras.
- 2) Empotradas o móviles.
- 3) Verticales u Horizontales.
- 4) Con generación de vapor propia o vapor externo.
- 5) Secadoras o no secadoras.

1) AUTOCLAVES DE UNA O DOS CÁMARAS

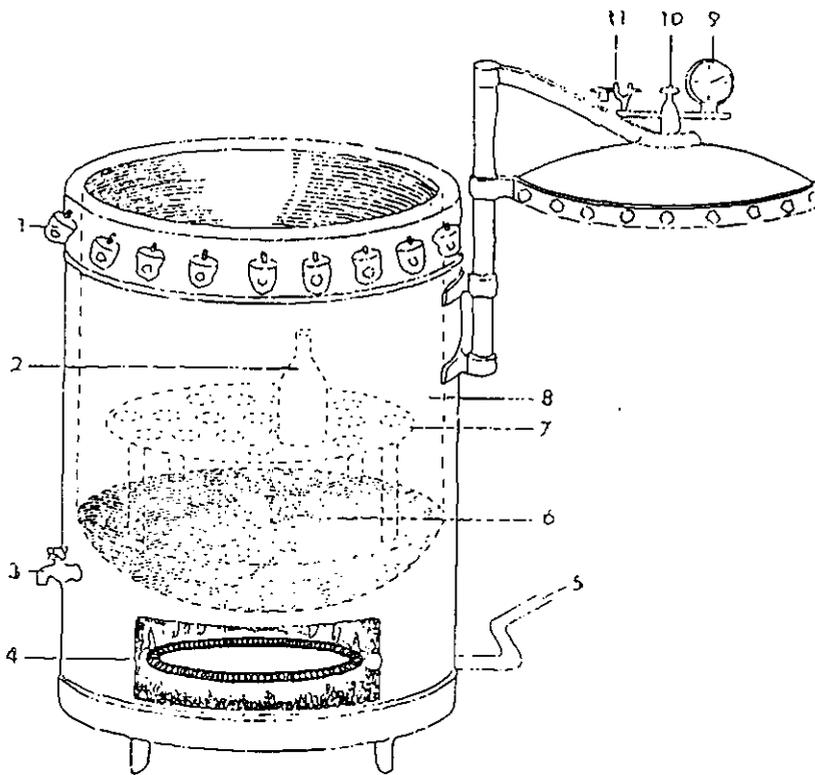
El autoclave de un cámara (Chamberland) posee una sola cámara, es de forma cilíndrica y vertical de pie y por tanto desplazable, además posee generación de vapor propia, este tipo de autoclaves es el más común en un laboratorio microbiológico:

Partes del autoclave:

- 1.- Tornillos móviles para el cierre hermético
- 2.- Objeto a esterilizar
- 3.- Llave de desagüe de la caldera

- 4.- Fuente de calor
- 5.- Agua
- 6.- Vapor de agua
- 7.- Rejilla para separar los objetos del agua
- 8.- Caldera
- 9.- Manómetro
- 10.- Espita
- 11.- Válvula de seguridad

Figura 1



FUNCIONAMIENTO

La tapa se desplaza y se vierte agua en el interior de su cámara hasta que la misma alcance el nivel de la rejilla donde serán depositados los objetos a esterilizar. Se carga el material a esterilizar y se cierra el autoclave, ajustando los tornillos de su tapa en posición cruzada a fin de asegurar un cierre hermético parejo. Se enciende la fuente de calor y se abre la espita para desalojar el aire interior, que de esta manera el manómetro marca la presión de vapor que se alcanzará durante el proceso y no la presión de aire atmosférico que puede quedar acumulado dentro de la autoclave al cerrar su tapa.

Se debe verificar el correcto estado de la válvula de seguridad, cuando se comienza a salir vapor por la espita, se cierra y se espera hasta alcanzar las condiciones de presión y temperatura adecuadas, en ese momento se cuenta el tiempo de esterilización (el tiempo también depende de los objetos a esterilizar) y se deja que el excedente de vapor salga por la válvula de seguridad. Cumpliendo todas las condiciones y transcurrido el tiempo se apaga la fuente de calor y se abre lentamente la espita para desalojar el vapor, cuando el manómetro llega a cero se abre la autoclave y se extraen los objetos ya esterilizados.

Si durante el proceso se observa alguna fuga de vapor debe interrumpirse el proceso, pues esto trae anomalías en el funcionamiento y la esterilización será deficiente.

VALIDACION DE LA AUTOCLAVE

En el capitulo anterior en el Protocolo de Validación se mencionó que se debe llevar un plan escrito donde se especifica la manera de conducir la validación incluyendo parámetros de prueba del equipo y puntos de decisión acerca de lo que se entiende por resultados de prueba aceptables, proporcionando confianza en el equipo al operar consistentemente dentro de los límites de tolerancia establecidos. Esto incluye examinar el diseño del equipo, mantenimiento y ajuste, requerimientos de calibración (cuando sean necesarios) y todas sus características.

Los resultados de prueba aceptables reúnen los siguientes criterios:

- 1.- Equipo confiable
 - 2.- Equipo seguro
 - 3.- El conjunto de instrumentos pueden controlar y registrar.
 - 4.- Tiempo de respuesta
 - 5.- Pruebas de distribución del calor conducidas con el número adecuado de termopares
 - 6.- Pruebas con esporas biológicas
- Temperaturas de
 $\pm 1.0^{\circ} \text{C}$
- Presiones de ± 20 atms

PERO DEBEMOS DEFINIR QUÉ ES UN TERMOPAR

Termopar es un instrumento para registrar la temperatura y registrar las condiciones de carga en un autoclave. Estos constan de uno o más sensores (sondas finas compuestas de dos metales diferentes, por ejemplo cobre/estaño) se colocan en puntos de prueba dentro de la carga del autoclave y los conductores son llevados al exterior a través de válvulas en la pared del autoclave y conectados a un galvanómetro, cuyo cuadrante da lecturas constantes de la temperatura en los puntos de prueba.

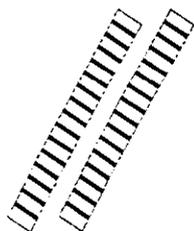
Esta también la prueba de Bowie-Dick para detectar aire residual o fuga en un autoclave de alto vacío durante el ciclo aunque es adecuada para otro tipo de autoclaves.

Esta prueba consiste en:

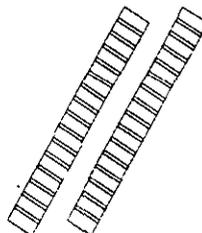
Se hace un paquete con pequeñas toallas (de 0.060 x 0.060 cm) lavadas, secas y apiladas, hasta una altura de 25 a 30 cm, entre las cuales se coloca una cruz de cinta para autoclave sobre una hoja de papel (cuidando que esta no sea de papel encerado) se envuelve firmemente, se coloca en el autoclave en la rejilla del fondo. Se corre el ciclo normal y los resultados serán:

FIGURA 2

SATISFACTORIO



NO SATISFACTORIO



Otra forma de validar el autoclave es con la prueba de fuga de aire, es un método de detectar escape de aire en la cámara por una válvula defectuosa o por un puerta mal cerrada. Se cierra el autoclave, se hace vacío por aspiración con control manual y entonces se cierran las válvulas para aislar la cámara. El vacío tiene que permanecer constante; una disminución de éste de más de 10 mm de Hg mantenida durante 10 minutos indica paso de aire y la máquina requiere entonces de servicio especializado.

Es importantísimo en un laboratorio microbiológico hacer una validación o prueba microbiológica en el autoclave la cual consiste en colocar esporas resistentes al calor, los más usuales son *Bacilos Stearotherophilus*, en paquetes de prueba en una carga normal, después de esto se cultivan durante aproximadamente 5 días. Los resultados de un autoclave en buen estado debe indicar la muerte de estas esporas.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN PARA AUTOCLAVES DE VAPOR

Protocolo No. 0001 (Comité Nacional de Validación).

“Protocolo para ciclo de esterilización utilizando vapor saturado en el Autoclave No. ___x___”.

OBJETIVO

Demostrar que el ciclo de esterilización utilizando vapor saturado en el autoclave No. de serie ___x___, es confiable, efectivo y reproducible.

INSTRUMENTOS DE PRUEBA

Termopares tipo T calibrados.

Registradores multipunto (existen de varias marcas y modelos entre ellos están los Kaye, Digistrip III, IV-S Plus, etc.

Tiras de esporas Microbiológicas de *Bacillus stearotherophilus* con población de 10 exponente 6 esporas por cinta, como alternativa podrán utilizarse cintas con *B. stearotherophilus* con. 10 exponente 5 con *B. subtilis* conc. 10 exponente 6 combinados.

PROCEDIMIENTO

Estudio de distribución de calor con cámara vacía y/o con carga.

Estudio de penetración de calor.

Dependiendo del número de canales disponibles en el registrador electrónico, se podrá llevar a cabo en forma simultánea los estudios de distribución, penetración y reto biológico.

Determinar el punto frío con cámara vacía. Siendo el punto frío aquel en el que se da el valor de temperatura más bajo dentro de la cámara.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Estudio de distribución de calor - cámara vacía. La diferencia entre las temperaturas de los termopares no deben ser mayor de 1.5°C., sin incluir el T/P15, el cual se encuentra junto al sensor del registrador del equipo. Debido a que durante los primeros minutos de exposición el sistema está equilibrándose, es posible observar desviaciones mayores a 3°C.

ESTUDIO DE PENETRACIÓN DE CALOR

Todos los termopares seleccionados deberán de presentar un tiempo de exposición mínima de 15 minutos a 121 °C o más. Ningún indicador biológico debe mostrar crecimiento después de 7 días de incubación.

AUTORIZACIONES

4.2 HORNOS

El horno es un gabinete provisto de un calentador en su interior como parte de su construcción, que nos permite obtener temperaturas más elevadas dentro del gabinete que las del exterior.

Las temperaturas requeridas se controlan mediante un termostato, que se compone por lo general de una lamina de dos metales que opera como conmutador o interruptor eléctrico, conectada a una fuente de energía para obtener el calentamiento. Si se soldan entre si dos metales con diferente índice de expansión, el calor hará que uno de ellos se expanda más que el otro, haciendo que toda la lamina se doble. Cuando se conecta esta lamina a un interruptor eléctrico, se interrumpirá el circuito y el calentador dejará de funcionar hasta que la temperatura descienda lo bastante para que la lamina metálica tome de nuevo su forma original . Siendo así que el horno soporte temperaturas de 100 ° C o más.

El calor que se transfiere desde la fuente a la carga del horno es por conducción. En un horno se requieren temperaturas altas y un tiempo de expansión también comparativamente alto. El tiempo de exposición se mide siempre desde el momento en que el centro de la carga alcanza la temperatura requerida; ésta varia según el volumen de la carga y el tipo de material sometido al proceso necesitando un control cuidadoso y verificación del aparato.

El horno más común es el de aire caliente, en el cual la relación estándar temperatura/tiempo es de 160° C durante 60 minutos. El ciclo total es consideradamente más largo por cuanto incluye el tiempo requerido para que toda la carga alcance 160° C y se enfríe después de la esterilización. Los hornos de aire caliente deben tener un ventilador que asegure la circulación del aire y que la temperatura sea homogénea dentro de éste.

PARTES DEL HORNO DE AIRE CALIENTE:

- a.- Doble pared de cobre (y suelen estar revestidos de amianto u otro metal aislante)
- b.- Puerta hermética
- c.- Orificio para el aire
- d.- Orificio para termómetro
- e.- Fuente de calor
- f.- Llave o manija graduada
- g.- Rejillas o estantes cribados.
- h.- Interruptor.
- i.- Indicador de Temperatura luminoso.

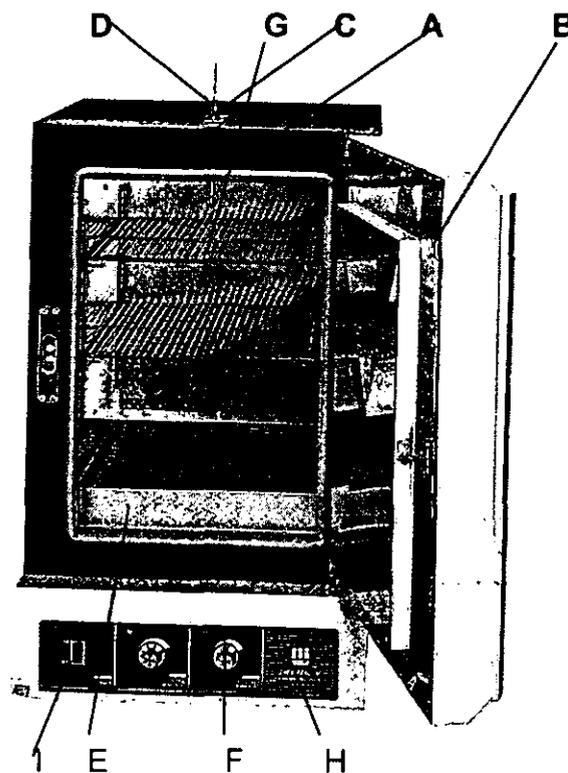
FUNCIONAMIENTO

Una vez acondicionados los objetos a esterilizar (ver capítulo V) se debe definir las condiciones del proceso de esterilización controlando principalmente el estado del termómetro y la graduación del paso de aire. El termómetro debe ir insertado en uno de los orificios del horno que se encuentra en la parte superior de éste. Se carga el horno, evitando que los objetos toquen las paredes y que se permita el paso de aire caliente para que circule fácilmente en forma vertical. Se cierra la puerta cerciorándose que esté cierre sea hermético, el orificio para el paso de aire está provisto de un sistema que le permite cerrarlo o abrirlo de manera parcial, para graduar la entrada de éste al espacio existente entre las dos paredes y facilitar así la circulación del calor por todo el horno.

Se enciende el horno por medio del interruptor conectado a la fuente de calor (electricidad), para que la temperatura comience a elevarse paulatinamente, controlándola por la llave o manija graduada (hasta 160°C), el indicador luminoso nos señala cuando la temperatura queda estable y hasta este momento, se comienza a contar el tiempo.

Es muy importante cuidar el calor, porque de existir algún inconveniente, el proceso se interrumpirá en forma inmediata. Se debe tomar nota del momento en que empezó el proceso pues no deben excederse los tiempos de esterilización (de 60 a 65 min.), cumpliéndose dicho período se gira la llave de control hasta cero dándose en ese momento por terminado la operación.

Figura 3



VALIDACION DEL HORNO

Los criterios de aceptación en la validación incluyen lo siguiente:

- 1.- Equipo confiable.
- 2.- Equipo seguro.
- 3.- Instrumentos que puedan controlar la temperatura dentro del intervalo de $\pm 5^{\circ}\text{C}$.
- 4.- El tiempo de respuesta del termopar no deberá exceder de 4 segundos.

5.- Gráficas de Temperatura.

6.- Aire filtrado HEPA en el suministro de éste.

7.- Pruebas de distribución de calor con un mínimo de 10 termopares para poder trazar la ruta de distribución de calor en la cámara.

8.- Pruebas con endotoxinas biológicas.

Las gráficas de temperatura registran el tiempo del ciclo y la temperatura dentro del horno pero no dentro de la carga. El termopar es esencial para establecer el ciclo de tiempo correcto.

Una prueba más son las sustancias químicas y las cintas termosensibles que se usan para indicar, por el cambio de color, que un objeto ha sufrido un proceso completo de esterilización por calor seco.

Nota; es importante efectuar una precalibración y una postcalibración. El equipo que se encuentra mal calibrado después de las pruebas ponen en peligro el éxito de ellas.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN PARA HORNOS

Protocolo No. 0002 (Comité Nacional de validación)

"Protocolo para el ciclo de esterilización/despirogenización utilizando calor seco en el horno de _____X_____".

OBJETIVO

Demostrar que el ciclo de esterilización/despirogenización utilizando calor seco en el horno de _____X_____ es efectivo, confiable y reproducible.

INSTRUMENTACIÓN DE PRUEBA

Termopares tipo T calibrados.

Registrador multipunto Kaye, Digistrip III, IVS-Plus o similar.

Frascos ampula contaminados con endosporas = > 50.000 U.E (Cuando sea requerido).

PROCEDIMIENTO

Estudio de distribución de calor con cámara vacía y/o con carga.

Estudio de penetración de calor.

Dependiendo del número de canales disponibles en el registrador electrónico, se podrán llevar a cabo en forma simultánea los estudios de distribución, penetración y reto biológico.

Determinar el punto frío con cámara vacía.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Estudio de distribución de calor - cámara vacía.

La diferencia entre las lecturas de los termopares no deberá ser mayor de +/- 50 °C., durante los últimos 15 minutos de exposición y el punto más frío deberá alcanzar por lo menos 120°C., sin incluir el T/P 15, el cual se encuentra junto al sensor del registrador del equipo. Debido a que los primeros minutos de exposición el sistema esta equilibrándose es posible observar desviaciones mayores a 30 ° C.

Estudios de penetración de calor - cámara vacía.

Todos lo termopares deberán presentar un tiempo de exposición mínimo de 10 minutos a 120°C., o más. Durante el análisis de la información tanto los estudios de distribución como de penetración de calor se podrán tomar 10 termopares como referencia mínima.

Ningún indicador biológico (endotoxina) deberá proporcionar resultado positivo utilizando la prueba L.A.L. (Cuando se haya realizado reto biológico).

AUTORIZACIONES

4.3 REFRIGERADORES

Es un aparato que sirve para conservar y almacenar reactivos, sueros, medios de cultivo y cepas Microbiológicas. Es la operación de extraer calor de un sistema para mantener temperaturas subatmosféricas.

FUNCIONAMIENTO

La sustancia que absorbe calor se llama refrigerante. Los métodos de refrigeración se clasifican en naturales y mecánicos. Los naturales comprenden el uso del hielo natural, "hielo seco" (dioxido carbónico sólido, nieve carbónica) y aguas profundas frías; los tres se usan con alguna extensión para la conservación de alimentos, pero sólo los dos últimos tienen aplicación industrial. Pero el uso de los métodos naturales es muy limitado.

Los métodos mecánicos proveen la mayor parte de la refrigeración industrial y presenta tres rasgos característicos:

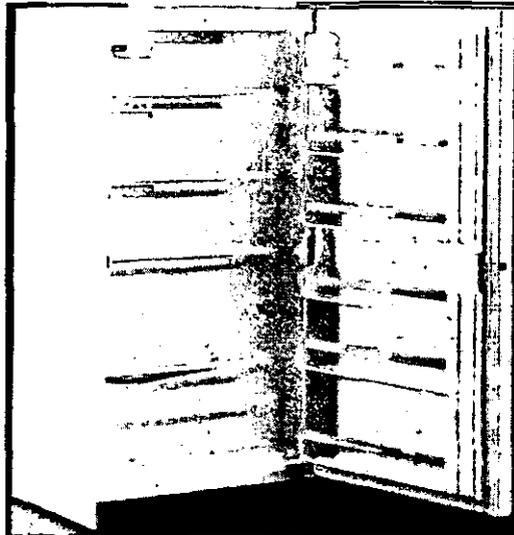
- 1) La sustancia llamada refrigerante está confinada y se usa una y otra vez, continuamente.
- 2) El calor sustraído por el refrigerante a una temperatura baja se eleva a una temperatura más alta mediante el gasto de energía mecánica, y luego se desecha.
- 3) El refrigerante cambia repetidamente entre las fases de vapor y líquido, durante su ciclo.

Los métodos mecánicos hoy importantes son la compresión del vapor del refrigerante, la absorción y los sistemas de chorro de vapor de agua. Los sistemas de refrigeración mecánica se clasifican también en base a los pasos de transferencia de calor.

La refrigeración mecánica se usa en muchas industrias de proceso químico y en laboratorios microbiológicos tales como:

Acondicionamiento de aire	Recuperación de vapores condensables
Condensadores de gases y vapores	a) Gases desprendidos de una reacción
Cristalización	b) Gases extraídos de un sistema de vacío.
Liofilización (desección por congelación)	
Enfriamiento de productos	
Conservación de cepas microbianas y medios de cultivo.	
Otras	

FIGURA 4



En los refrigeradores no se aplica un sistema de validación como en los hornos o autoclaves como anteriormente hemos descrito, sino que se elabora un estudio de distribución de calor en los niveles de temperatura de operación.

Para este fin podemos enunciar el siguiente procedimiento:

EQUIPO

- a) Registrador de Temperatura
- b) Termopares tipo "T"
- c) Baño de Temperatura

PROCEDIMIENTO

Coloque de 10 a 15 termopares en sitios predeterminados de la cámara. Uno de los termopares deberá ser colocado lo más cerca posible del sensor que registra la temperatura de la cámara.

Evalúese la distribución de calor a la temperatura de operación correspondiente, registrando las temperaturas marcadas por los termopares durante un periodo de 15 minutos.

Registrar los resultados obtenidos y graficar la temperatura media obtenida en función del tiempo.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

La temperatura registrada por todos los termopares deberá estar dentro del rango especificado por el diseño del equipo y/o el usuario del mismo.

4.4 POTENCIOMETROS

En el estudio de los microorganismos sabemos que necesitan nutrientes indispensables para su crecimiento entre otros factores como temperatura, concentraciones de sales e iones y un pH óptimo.

Como podemos observar el pH es uno de esos factores importantes, por tanto dedicaremos un espacio al estudio del concepto de pH y su medición.

El término pH fue introducido en 1909 por Sorensen, quien definió el pH como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno:

$$\text{pH} = -\log \text{H}^+$$

Esta definición es adecuada para muchos fines tanto químicos como microbiológicos, pues es necesario para preparar soluciones acuosas, entre ellas los medios de cultivo en su estado inicial de preparación (líquido). Para calcular el pH de una solución se necesita:

- 1) Calcular la concentración de iones hidrógeno H^+
- 2) Calcular el logaritmo de base 10 de H^+
- 3) El pH es el negativo del valor encontrado en el paso anterior.

Los valores bajos de pH (inferiores a 7.0) corresponden a concentraciones elevadas de H^+ (soluciones ácidas) y los valores altos de pH (superiores a 7.0) a concentraciones bajas de H^+ (soluciones básicas).

En las disoluciones acuosas las propiedades ácidas normales se deben a los iones hidrógeno y las propiedades básicas comunes son debidas a los iones hidroxilos. Si la concentración del ion hidrógeno es mayor de 1×10^{-7} mol/litro se dice que la solución es ácida; si la concentración de estos dos iones es constante (1×10^{-14}), solo es necesario indicar la concentración de uno de ellos para conocer la cantidad de la acidez o alcalinidad de la disolución.

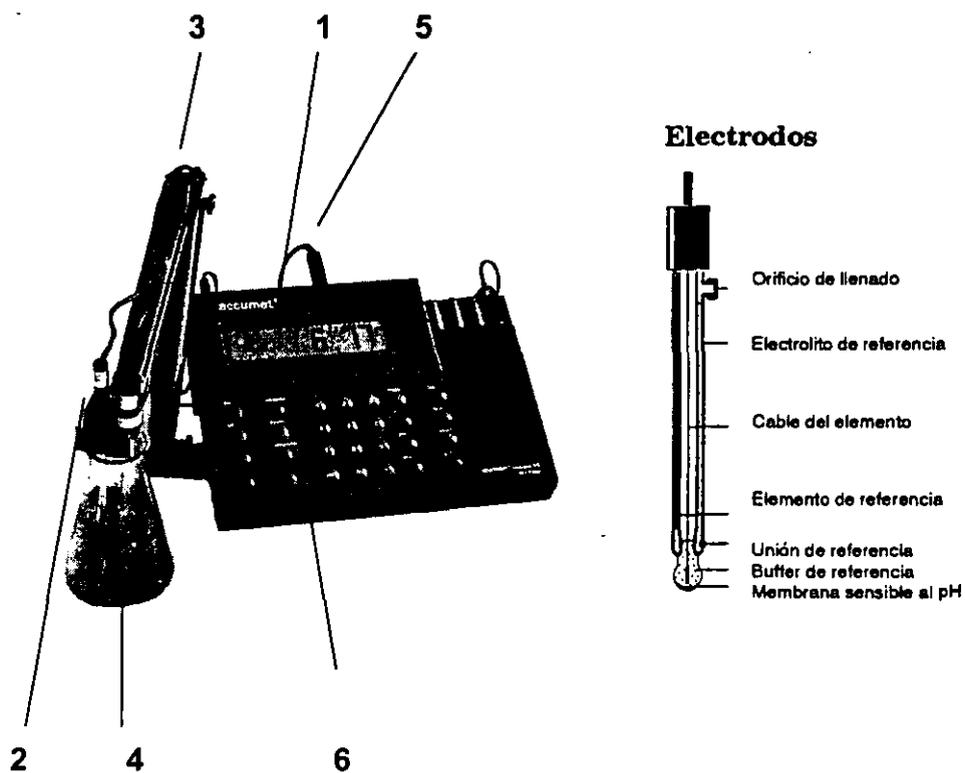
Un método muy empleado para indicar la concentración del ion hidrógeno de los ácidos y bases diluidas y de las soluciones neutras consiste en expresarla en función de pH. El logaritmo decimal de un número es el exponente a que debe elevarse el número diez para obtener el número en cuestión. Si el pH es 7 la solución es neutra; si el pH es inferior a 7, la solución es ácida, y si el pH es superior a 7, la solución es básica.

La determinación de la concentración del ion hidrógeno, o del pH, de una solución exige el empleo de métodos rápidos y exactos, para este fin se cuenta con el potenciometro o pH metro. O métodos más sencillos pero imprecisos como el papel tornasol y el papel pH.

AMORTIGUADORES O SOLUCIONES BUFFER

Un amortiguador es una solución que tiende a resistir eficazmente un cambio de pH después de la adición de un ácido o una base.

FIGURA 5



Los potenciometros constan de:

1.- Pantalla

2.- Electrodo que a su vez cuenta con {Orificio de llenado

Elemento de referencia

Electrolito de referencia

Unión de referencia

Cable del elemento

Buffer de referencia

Membrana sensible al pH

3.- Brazo portaelectrodo

4.- Sol. Buffer 4,7 y 10

5.- Cable alimentador de energía

6.- Botón controlador.

FUNCIONAMIENTO

El funcionamiento de un potenciómetro es muy fácil pues solo consiste en:

Una vez preparada la solución en la cual se determinará el pH, se calibra el instrumento a 7 o neutral con soluciones buffer, se sumerge el electrodo en la solución en cuestión y se hace la lectura.

Además se debe saber que no existe un método de validación de estos instrumentos, la forma de mantener resultados precisos, reproducibles y confiables es por medio de la calibración que se hace antes de su uso, sin descartar el previo a su manejo.

4.5 INCUBADORAS

El proceso de incubación reviste una importancia decisiva en los resultados de los análisis microbiológicos. Numerosas experiencias muestran la magnitud de una variabilidad claramente definida en el caso de las pruebas cuantitativas, cuando las condiciones en las que se lleva a cabo la incubación no son debidamente controladas.

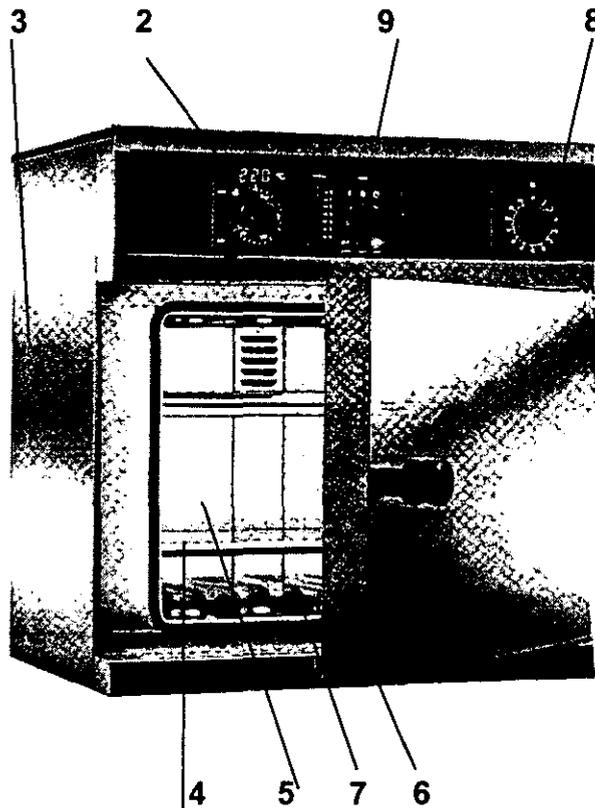
Al registrarse el desarrollo de un determinado grupo de microorganismo, si la temperatura de incubación se eleva o disminuye con respecto a su óptima, otros grupos de microorganismos presentes pueden manifestarse con preponderancia. El recuento obtenido, será diferente si tal restricción por defecto de la incubación, no hubiera ocurrido.

Muchos microorganismos presentan crecimiento óptimo a temperaturas cercanas a la del cuerpo (37°C). Para alcanzar y mantener esta temperatura se puede usar una incubadora bacteriológica o un baño de agua a temperatura constante. En general, la incubadora satisfecerá todas las necesidades en cuanto al cultivo de organismos a temperaturas relativamente altas.

Una incubadora bacteriológica consta de las siguientes partes:

- 1.- En su mayoría miden interiormente 33 cms. de alto x 30 cms. de frente x 28 cms. de fondo, medidas utilizables.
- 2.- Controlador de termostato
- 3.- Estructura metálica de doble cuerpo
- 4.- Uno o dos entrepaños metálicos
- 5.- Puerta interior de vidrio
- 6.- Puerta metálica con aislamiento en el interior (hermética)
- 7.- Circuito electrónico de calefacción (monofásico para operar en 127 volts 50/60 ciclos).
- 8.- Regulador de temperatura (37° a 60° C.y sensibilidad de 0.5°C)
- 9.- Orificio con adaptador para termómetro.

FIGURA 6



FUNCIONAMIENTO

El funcionamiento de este equipo se basa en la transferencia de calor seco que se transmite en el interior de su cámara por medio de sus circuitos electrónicos (resistencias) una vez activada o encendida y con el regulador de temperatura seleccionar la más adecuada.

Los siguientes factores son los que mayor frecuencia y más acentuadamente influyen en la incubación:

a) Uso de incubadoras con resistencias de rápido calentamiento que dan lugar a un calor excesivo en zonas próximas a su instalación.

- b) Defectuosa circulación del aire por sobre carga de material e incluso empleo de charolas en su interior.
- c) Defectuoso cierre de las puertas.
- d) Humedad excesiva que favorece el desarrollo extensivo de algunos microorganismos en la superficie de las placas de cultivo, o insuficiente, lo que hace perder agua en el medio modificando su composición.
- e) Defectuoso funcionamiento del termostato.

Además la práctica viciosa, de utilizar la incubadora para secar el material de vidrio y la apertura frecuente e indiscriminada de la puerta de la incubadora da lugar a variaciones de su temperatura interior. En la medida en que los horarios para introducir y retirar cultivos se sistematice, y para ello la puerta solo se abra lo indispensable, las variaciones resultantes serán mínimas.

VALIDACIÓN DE LA INCUBADORA

Como en el párrafo anterior se menciona debe existir una sistematización de horarios para introducir los cultivos, pues no será posible concebir resultados con un grado aceptable de precisión, sensibilidad y exactitud, en tanto a los registros de las temperaturas actuales de la incubadora no sean reales y/o sistemáticos.

La validación de la incubadora se basa en la demostración de distribución de calor, en la cámara y la temperatura de operación correspondiente, sea uniforme y reproducible. Para este fin se utiliza el equipo y el procedimiento siguientes:

EQUIPO

- 1.-Registrador de temperatura
- 2.-Termopares tipo T
- 3.- Baños de temperatura constante

PROCEDIMIENTO

Coloque de 10 a 15 termopares en sitios predeterminados de la cámara. Uno de los termopares deberá ser colocado lo más cerca posible del sensor que registra la temperatura de la cámara.

Evaluar la distribución de calor a la temperatura de operación correspondiente, registrando las temperaturas marcadas por los termopares durante un periodo de 15 minutos. Reportar los resultados obtenidos y graficar la temperatura media obtenida en función del tiempo.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

La temperatura registrada por todos los termopares deberá estar dentro del rango especificado por el diseño del equipo.

La temperatura del aire dentro de la cámara, no refleja la temperatura actual del medio de cultivo; se tiene mucho mejor imagen de esta última si el termómetro se encuentra con el bulbo sumergido en agua. Asimismo hay que ser consciente en todo momento que la temperatura registrada en una localidad determinada; no es necesariamente la misma en todo su interior. Es indispensable llevar varios registros, al menos dos, (dependiendo de la capacidad del aparato), mediante el empleo de termómetros en puntos representativos del aparato.

4.6 CAMPANAS DE FLUJO LAMINAR

Un gabinete o campana de seguridad biológica es un dispositivo que encierra un área de trabajo en forma tal que evita la exposición del usuario (laboratorista, profesor, alumno, etc.) a los agentes infecciosos.

El aire que pasa sobre el material infeccioso es esterilizado ya sea por calor, luz ultravioleta o más comúnmente al pasar a través de filtros de alta eficiencia para partículas aéreas (HEPA), que retienen la mayoría de las partículas mayores de 0.3 micras de diámetro.

Existen varias clases de campanas según el grado de aislamiento biológico que confieren:

a) Clase I ; permiten que el aire del ambiente (no esterilizado) penetre y se ponga en contacto con el material inferior, esterilizando sólo el aire que se expulsa al exterior (figura A). Se conocen también como horizontales.

b) Clase II: esterilizan el aire que fluye sobre el material infeccioso así como el que es expulsado. El aire fluye sobre "laminas" que sirven de barrera a las partículas externas y que dirigen el flujo del aire contaminado hacia el filtro (figura B). Identificando dentro de esta clase a las campanas de flujo laminar. Estas pueden subdividirse en Clase IIA que poseen una abertura fija, mientras que las de Clase IIB tienen una ventana de guillotina, variable; donde a través de ella el operador tiene acceso a la superficie de trabajo. Se conocen también como verticales.

c) Clase III: ofrecen la mayor protección para el usuario ya que son completamente cerradas y poseen presión negativa. El aire que entra y sale es esterilizado por filtración y el material infeccioso que se encuentra en el interior es manipulado mediante guantes de goma que están unidos y sellados a la campana (figuras C y D).

La técnica del flujo laminar, permite controlar la contaminación microbiológica en el aire mediante dos procedimientos básicos; uno la introducción por medio de filtros absolutos (HEPA) de aire estéril ya que estos retienen partículas desde 0.3 micras en adelante y su diseño interno obliga a las partículas a detenerse en el medio filtrante; su alta eficiencia evaluada electrónicamente de 99.97 a 99.997 %, permite asegurar este resultado.

El segundo procedimiento es la introducción de esa masa de aire ultrafiltrado en un ambiente confinado a velocidades muy bajas, con lo cual el aire se mantiene en la misma dirección y tomando la forma de los objetos que se encuentran dentro de la zona de trabajo evitando la contaminación exterior y aquella que podrá provenir de la zona de trabajo.

Las campanas de flujo laminar, por su gran versatilidad, tienen un gran número de aplicaciones:

Líneas de llenado de productos Farmacéuticos y Alimentación.

Quirófanos en zonas hospitalarias.

Áreas de quemados.

Salas de recuperación.

Salas para pacientes con tratamientos inmunológicos

Salas de siembra en ceparios microbiológicos

Laboratorios clínicos, etc.

Existe una división más de las campanas de seguridad biológicas:

1.- Horizontales

2.- Verticales

3.- Clase III

4.6.1 CAMPANAS DE FLUJO LAMINAR HORIZONTALES

Las campanas de flujo laminar horizontales son dispositivos electromecánicos que nos permiten obtener una zona estéril para aplicaciones tales como: pruebas de laboratorio clínico, lectura de cultivos y preparación de medios de cultivo, siembras no patógenas, preparación de soluciones hipertónicas, preparación mezclas con soluciones intravenosas, llenado de productos estériles, tales como soluciones parenterales y antibióticos, en general este tipo de unidad es idóneo para todas aquellas actividades que requieren esterilidad y que al mismo tiempo no son patógenas las actividades

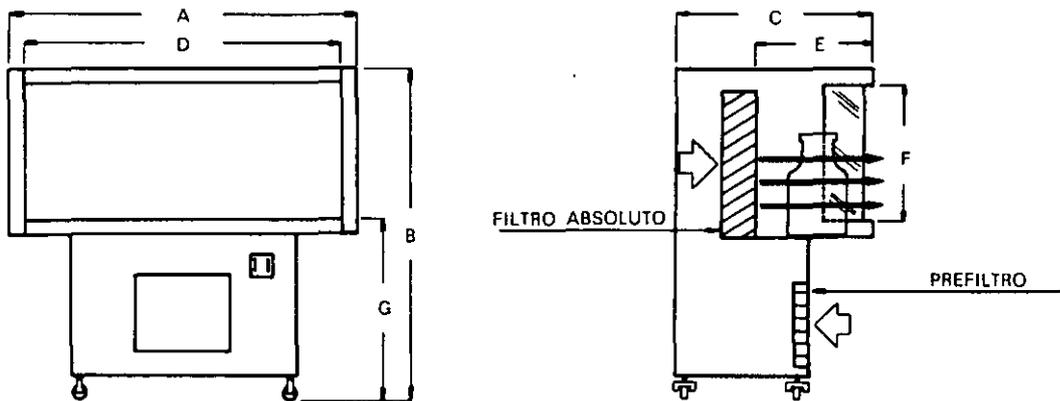
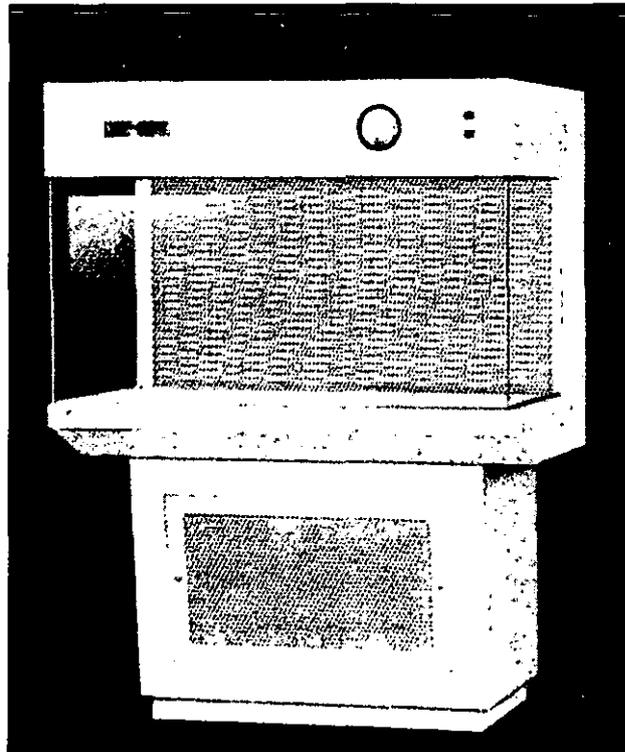
que ahí se realizan para el personal que opera el equipo, pues en caso de ser así, se requiere una unidad de flujo laminar vertical. Una de las grandes ventajas del flujo laminar horizontal en campanas es su alto grado de operar, pues no tiene bocamangas o elementos que limiten la capacidad de acción.

Las dimensiones de estas campanas depende de su utilización, dentro del mantenimiento de éste equipo se debe incluir una verificación del sistema de filtración con equipo electrónico una vez cada cuatro meses (servicio que en su gran mayoría ofrece su distribuidor).

Están construidas en su exterior por lamina de acero inoxidable (natural o esmaltadas), sus paredes laterales son de Plexiglass (material comercial no reactivo) y cristal en sus ventanas. El flujo de aire horizontal fluye a velocidades bajas (máximo 110 pies/min).

Dentro de sus partes importantes incluye un moto-ventilador trifásico de bajo nivel de ruido. Y su principal pieza son los filtros absolutos HEPA con eficiencia de 99.97 % diseñados para bajo nivel de ruido, equipados con sellos de plástico especial y prefiltros de fibra de vidrio impregnada. (Estas unidades deben cumplir con el Federal Standard 209 A de los E.A.U.).

FIGURA 7



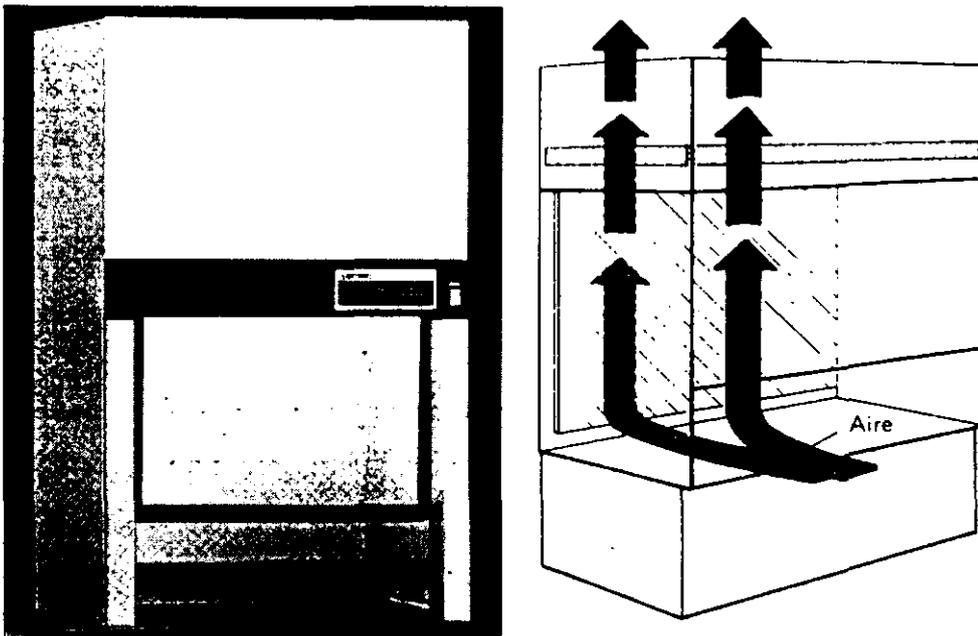
4.6.2 CAMPANAS DE FLUJO LAMINAR VERTICAL

Las campanas de flujo laminar vertical, ofrecen dos ventajas a la vez: primero, garantizan la esterilidad en el área de trabajo y segundo,

permiten el retener la contaminación generada en ésta, en el filtro absoluto el cual mediante un procedimiento especial, puede retirarse sin perjuicio de contaminar al usuario. Las campanas de flujo laminar vertical, pueden realizar las mismas actividades que se efectúan en las unidades de flujo laminar horizontal, más todas aquellas que por su tipo de trabajo pueden contaminar al usuario.

Este tipo de unidades pueden también trabajar a presión positiva o en ambientes negativos, según el caso de la operación que se realice, pueden contar también con chimeneas para extracción de humo y de olores generados en el área interior de la campana. La construcción de estas es muy similar a las horizontales con la opción de que puede contar con bocamangas.

FIGURA 8



4.6.3 CAMPANAS DE SEGURIDAD BIOLÓGICA TIPO III

Estas campanas están diseñadas para proteger al usuario de agentes bacteriológicos, radioisótopos y químicos cancerígenos, ya que crea una barrera física entre el material con el que se esté trabajando y el personal que opera la campana. Están fabricadas en acero inoxidable con acabados de tipo sanitario y su construcción permite una fácil limpieza. Tanto el aire que entra, como el que sale de la campana, se hace pasar a través de filtros absolutos HEPA con eficiencia de 99.997 % en partículas de 0.3 micras y mayores. Se utiliza un prefiltro de fibra sintética, para aumentar la vida útil del filtro de admisión de aire.

Cuenta con dos puertas de aproximadamente 20 cm de diámetro y separación de 18 cm entre ellos (lo que permite máxima capacidad de movimiento), para colocación de guantes de neopreno. La ventana de observación, es de cristal templado de 9 mm de espesor preferentemente y está colocada con una inclinación de 10°, lo que evita al máximo los reflejos. Posee cámara de transferencia, para la entrada-salida del material de trabajo. Cuenta con contactos (auxiliares) iluminación (fluorescente), manómetros, higrómetros, luz ultravioleta (opcional).

FIGURA 9



FIGURA C

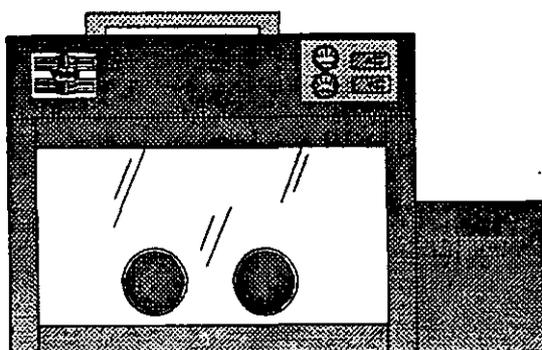
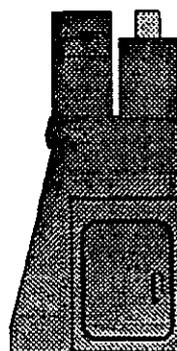


FIGURA D



4.7 MICROSCOPIO

El uso de un microscopio nos da la función de conocer la gran variedad de microbios y la determinación de su morfología.

Podemos dividir en forma general dos tipo de Microscopios:

a) Microscopios de Luz que emplean ondas de luz visible como fuente de iluminación y capaces de producir aumentos hasta de 1000 veces. La mayoría de estos aparatos son de fácil manejo y se utilizan en la mayoría de los laboratorios generales y de enseñanza.

b) Microscopio Electrónico. Utiliza un rayo de electrones como fuente de iluminación y es capaz de aumentar más de 100,000 veces la imagen.

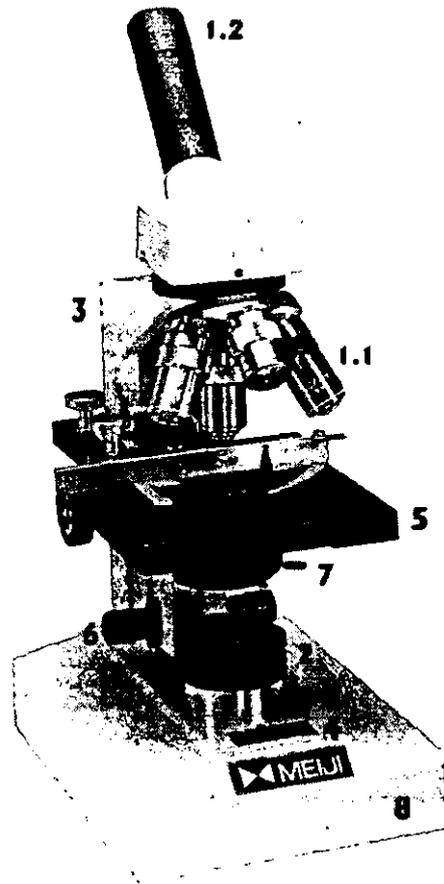
Estos tipos de aparatos son grandes, complejos y de costo elevado y están principalmente en laboratorios especializados y de investigación avanzada con personal altamente capacitado. Por tal razón nos dirigimos con más importancia al microscopio de luz.

MICROSCOPIO DE LUZ

El primer microscopio fue esencialmente un poco más pequeño que los lentes de aumento bastante complejos, éste se descubrió gracias a la gran habilidad y afición a los lentes de vidrio molido, originando microscopios de un lente que podían hacer ampliaciones hasta de 300 veces con un probable método de iluminación de campo obscuro. El microscopio y una infinidad más de descubrimientos microbiológicos se deben a Antony van Leeuwenhoek originario de Delf Holanda en el año de 1673 y fue honrado por la Real Sociedad de Londres como miembro honorario y ahora es conocido como el Padre de la Microbiología.

Posterior a esto Zacarias Jansens, en Dinamarca, desarrollo un sistema de aumento más poderoso creando el microscopio compuesto que en la actualidad casi todos los microscopios utilizados en la microbiología son microscopios de luz compuestos, es decir utilizan una serie de lentes para amplificar los objetos.

FIGURA 10



PARTES DE UN MICROSCOPIO

- 1.-Lentes de Aumento
 - 1.1. Objetivo
 - 1.2. Ocular
- 2.- Lente condensador de luz
- 3. Pieza nasal o brazo
- 4.- Encendedor de luz
- 5.-Plataforma mecánica
- 6.- Ajustador del foco
- 7.- Diafragma del condensador
- 8.- Base

FUNCIONAMIENTO

El lente llamado objetivo es el lente primario de aumento y se coloca cerca del material u objeto que se va a observar. El ocular está ubicado cerca del ojo del observador y produce un aumento secundario de la imagen creada por el objetivo. El lente condensador enfoca la luz sobre el objeto, pero no es parte del sistema de amplificación.

Las amplificaciones de los lentes objetivo y ocular proporcionan la amplificación total del microscopio compuesto. El aumento máximo que en la mayoría de las condiciones se puede obtener es cercano a 100 veces (100 X); y la mayoría de los microscopios compuestos tienen lentes objetivos que amplifican 10 X, 40 X, o 100 X. Estos lentes están montados en una pieza o base rotatoria llamada pieza nasal, para que los lentes puedan rotar fácilmente y moverse a la posición que sea necesario. La mayoría de los lentes oculares amplifican 10 X, aun cuando hay lentes disponibles de 1.5 X a 20 X. Así utilizando el ocular 10 X con lentes objetivos varios, se obtienen amplificaciones totales de 100 X (10 por 10), 400 X (40 por 10) o 1000 (100 por 10). Las amplificaciones más pequeñas se usan para observar áreas grandes de los objetos u objetos relativamente grandes, y las amplificaciones mayores se emplean para observaciones más detalladas o áreas seleccionadas de un objeto. Para la observación de la mayoría de los microorganismos se usan amplificaciones de 400 X, y 1000 X.

Teóricamente podrían hacerse combinaciones con los lentes objetivo de 100 X y un ocular de 50 X o 100 X para obtener amplificaciones de 5000 X o 10,000 X y así sucesivamente, pero esto no se logra por que la amplificación mayor no muestra detalles mayores, a esta amplificación se le llama "amplificación vacía", pues el poder de resolución (capacidad de distinguir objetos adyacentes) depende principalmente de la longitud de onda de la luz que se utilice.

La longitud de onda de la luz visible que se usa en los microscopios ópticos es de $0.5 \mu\text{m}$. Entonces el poder de resolución máximo que se puede obtener con lentes comunes es de cerca de la mitad de la longitud de ondas de luz aproximadamente de $0.25 \mu\text{m}$.

TIPOS DE ILUMINACION EN MICROSCOPIOS COMPUESTOS

Campo Brillante. Es el microscopio más común, la luz es enfocada directamente sobre el objetivo y la sombra resultante se amplifica y observa. Así, la imagen aparece como un objeto sombreado en un campo brillante (fondo). La mayoría de los objetos, como los microorganismos, tienen sólo un ligero contraste óptico con el medio que los rodea y proyectan una sombra muy débil.

Campo Oscuro. Aquí la luz se dirige sobre el objeto en un ángulo tal que sólo se amplifica y observa la luz reflejada del objeto. La imagen aparece brillante contra un fondo oscuro. Esta microscopia es útil para observar el movimiento de los microorganismos.

Contraste de Fases. Este tipo de microscopio utiliza un sistema especial de óptica que hace más visible los detalles de las células. Es útil especialmente para observar células vivas. Los distintos componentes de la célula tienen poca diferencia en sus índices de refracción. Estas diferencias hacen que los rayos de luz se doblen o refracten cuando pasan de una porción de la célula a la otra. La luz refractada se intensifica con el sistema óptico de un microscopio de contraste de fases y forma una imagen, en la cual se pueden ver muchos de los detalles finos de los componentes celulares.

Fluorescencia. Este tipo de microscopios permite observar materiales fluorescentes, es decir, materiales que emiten luz de un color cuando son sometidas a la luz de otro color. La mayoría de los microscopios fluorescentes utilizan luz ultravioleta como fuente de luz primaria, la luz emitida por el material fluorescente es color naranja, amarillo o verde. La luz ultravioleta es filtrada para evitar que dañe, antes de que sus rayos alcancen los ojos del observador.

No hay un método o procedimiento de validación de los microscopios, sin embargo siempre se debe regir la utilización de estos con una serie de cuidados que son indispensables para su buen uso, mantenimiento, cuidado y conservación.

Por ejemplo:

- a) Tomar el microscopio de su brazo con una mano y con la otra soportar su base hasta el sitio de trabajo.
- b) Antes de encender el microscopio limpiarlo perfectamente.
- c) Desenredar el cable, fuente de energía y conectarlo a la corriente eléctrica.

4.8 CÁMARA DE NEUBAWER

Con frecuencia es necesario determinar el número de microorganismos presentes en un cultivo o en el material para fines de investigación, para procesos industriales o para evaluar el estado sanitario general de un medio dado.

La cuenta directa de una población de microorganismos puede hacerse por examen microscópico en una cámara de cuenta, llamada hemocitrometro o hematímetro. Este nombre se debe a que fue ideado originalmente para contar los glóbulos rojos de la sangre.

Consta de un porta objetos grueso en cuya cara superior se han grabados dos cuadros o celdillas de 3 mm X 3 mm, finamente subdivididos. La muestra se coloca sobre cualquiera de las celdillas y encima se pone el cubreobjetos de vidrio, de tamaño y forma especiales, que debe manejarse con cuidado. Se ideó la cámara de manera que entre la superficie grabada y el cubreobjetos hubiera una distancia de 0.1 mm. Al hacer la cuenta de las células presentes en muestras de volumen conocido, tomadas de un cultivo de volumen conocido, se puede calcular la población de todo el cultivo o de cualquier parte del mismo. Para justificar esos cálculos se debe hacer todo lo posible para asegurarse de que los diminutos volúmenes que se cuentan sean muestras verdaderamente representativas, para lo cual hay que hacer un cierto número de repeticiones de la cuenta en nuevas muestras.

La zona cuadrículada de la celdilla tiene nueve cuadros que miden 1 mm² cada uno y que están subdivididos en unidades más pequeñas. Con esta amplificación no muy grande (100 X) del microscopio, solamente se puede observar un milímetro cuadrado de superficie. Esta superficie se muestra en la figura A encerada en un círculo y se utiliza para conocer el número de individuos de las poblaciones de microorganismos. La figura B es una ampliación del cuadro grande del centro de la cámara. Esta superficie de 1mm² está subdividida en 25 cuadros que miden 0.2 mm de lado (lo que da una área de 0.04 mm²).

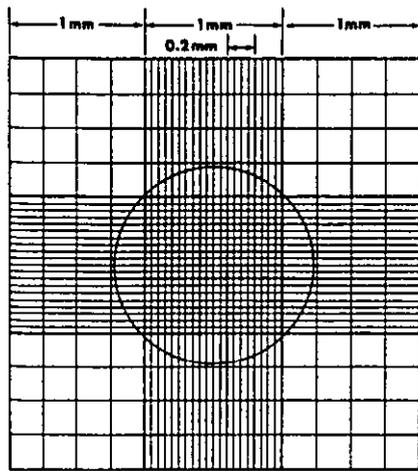
Cada cuadro central tiene una área de 1 mm²; sin embargo, en las técnicas de cuenta se considera el número de individuos presentes en un volumen determinado, más bien que en una superficie. Por lo tanto, debe considerarse una tercera dimensión: el espesor del líquido sobre la superficie reticulada. La distancia entre el fondo de la celdilla de recuento y la cara inferior del cubreobjetos de vidrio con que se cubre, es la profundidad que, en este caso, es de 0.1 mm. Ahora se puede calcular el volumen de uno de los cuadros grandes, que es igual a $1.0 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3$.

Comúnmente, las cuentas de microorganismos se indican con el número de individuos en cada mililitro. Así pues, si se han contado los organismos presentes en uno de los cuadros grandes, se puede calcular la cantidad existente en un mililitro del cultivo multiplicando el resultado del recuento por 10.

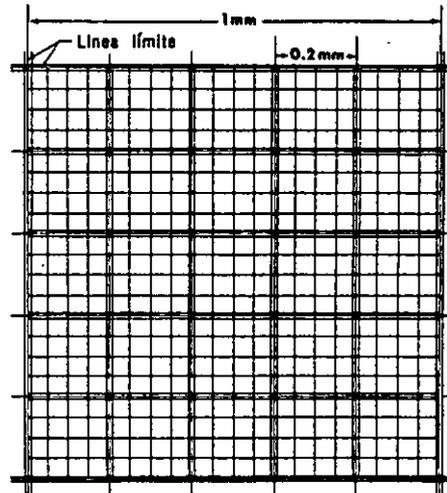
La única recomendación del cuidado de esta cámara es su perfecta limpieza y un trato delicado, ya que es de vidrio y puede romperse y/o rallarse. Es también conveniente que se guarde en su estuche original y en un lugar donde pueda localizarse fácilmente, y si es posible indicando con un letrero su nombre.

FIGURA 11





A



B

Al hacer la cuenta de las células presentes en una muestra representativa de volumen conocido de cultivo se puede calcular la población de todo un cultivo o de cualquier parte del mismo, haciendo un cierto número de repeticiones de la cuenta en nuevas muestras.

La zona cuadrículada de la celdilla tiene nueve cuadros que miden 1 mm² cada uno y que están subdivididas en unidades más pequeñas. Con la amplificación 100 X del microscopio se observa 1mm² de superficie (Figura A). Esta superficie está subdividida en 25 cuadros que miden 0.2 mm de lado. (lo que da un área de 0.04 mm²). En la cuenta se toma el número de individuos presentes en cada ml.

La distancia entre el fondo de la celdilla del recuadro y la cara inferior del cubreobjetos, es la profundidad que, en este caso, es de 0.1 mm. Ahora se puede calcular el volumen de uno de los cuadros grandes, que es igual a 1.0 mm² x 0.1 mm = 0.1 mm³. Entonces, si se han contado los organismos presentes en uno de los cuadros grandes se puede calcular la cantidad existente de 1 ml del cultivo multiplicando el resultado del recuento por 10; ya que 1 ml = 1 cm³ = 1,000 mm³ = 10,000 cuadros grandes de 0.1 mm³.

Por ejemplo: Una cuenta de levaduras en el cuadro grande es de 210. Expresado en números de células por ml, la población original contiene $210 \times 10,000 = 2.100,000$ células/ ml = 2.1×10^6 células x ml.

Para obtener el resultado lo más exacto posible deben contarse de 200 a 300 células.

CITAS TEXTUALES

12.-DENER an Braird. Ellis Horwood, Guide to Microbiological Control in Pharmaceutical

Series in Pharmaceutical Tecnology School of Health Sciences, Liverpool Polytenic 1992, pág. 182 - 213, 220 –240

13.-DICKINSON, Becton C. Medios de Cultivo, Materiales e Instrumentos para Laboratorio de Microbiología, Baltimore Bilological Laboratory Inc., 1995, pág. 262

16.-FENEGOLD, Sidney M., Ellen J. Barón, Diagnóstico Microbiológico, Buenos Aires, Argentina 1989, Edición Edit. Médica Panamericana, pág. 21 - 26, 65 – 68

18.-GUÍA Oficial de Validación de S.S.A. "Areas asepticas, hornos y autoclaves" México, D.F. 1990 pág. 2-21

19.- GUÍA Oficial de Validación de la S.S.A., "Hondos y Autoclaves", México 1991 pág. 2 – 14

20.- GUÍA Oficial de Validación de la S.S.A. "Filtros Asépticos y Sistemas de Generación de Aqua Calidad Inyectable" México 1991 pág. 3 - 12

27.- LÓPEZ, Mareen Luz Maria Dr. Niveles de Seguridad Bilógica, Comisión de Seguridad Madrid España, 1996 Pág. 1-2

32.-RAGAYNON, Priego Annabella. Tesis : Planeación, Organización y Control de un Laboratorio de Análisis Clínico Privado UNAM, México 1987 pág. 140

34.-RUÍZ Avilés David Q.B.P. CORTEZ Gómez Alicia I.B.Q., Manuales de Laboratorio Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias, México 1ª Edición 1983

36.-SOLANO, De C. Barbara, Hornos, Rev. J.M. Storch de Gracia y Ascensión, México, 1989.

CAPITULO V

V.- SANITISANTES

Lo mismo que los organismos varían en cuanto a los factores y condiciones necesarias para su desarrollo, también los microorganismos difieren en su respuesta a las condiciones adversas, tanto físicas como químicas. Algunos mueren con facilidad por una corta exposición a temperaturas relativamente bajas, como *Clostridium tetani*, otros permanecen vivos después de una larga exposición a temperaturas altas. Algunos microorganismos, en particular los virus, son relativamente susceptibles a un tipo de agente microbicida, pero resiste a otro. La susceptibilidad de un microorganismo a un agente mortífero se conoce como susceptibilidad innata del microorganismo y depende de muchos factores.

En la elección de un agente microbicida hay que considerar la susceptibilidad innata del microorganismo así como otros factores que han de influir en su acción:

- El tiempo necesario para que actúe.
- La concentración del agente microbicida.
- La acidez o alcalinidad óptimas para su actividad.
- La temperatura óptima
- El número de microorganismos presentes.
- El estado físico del material del cual es necesario eliminar a las bacterias (las proteínas, sangre, suciedad, etc.), actúan como cubiertas protectoras para las bacterias y limitan la acción del agente.
- El contacto directo entre todas las superficies del objeto que se va a sanitizar (o esterilizar) y el agente mortífero.
- Sustancias antagonistas que anulan la actividad del agente.
- Impurezas que diluyen al agente.
- Inactividad del agente por el tiempo.

La elección de un agente microbicida para un propósito particular es relativamente sencillo si se conoce al microorganismo contaminante, la elección del agente es amplia, siendo el factor limitante el tamaño y el tipo de material a desinfectar. El agente ha de ser tóxico para el organismo patógeno en concentraciones que no causen daño a los medios de cultivo, equipo, material o pacientes según el caso. El contacto del agente sanitizante con los microorganismos reduce el número de éstos; la mayoría mueren, y unos pocos sobreviven. Si los sobrevivientes siguen expuestos al contacto con el agente sanitizante acabarán muriendo prácticamente todos y con el tiempo, sobrevivirá sólo un porcentaje mínimo de microorganismos resistentes, en un 1 en 10⁶ con un método aceptable. El porcentaje de organismos sobrevivientes y el tiempo que lleva eliminarlos (matarlos) dependerá de varios factores: la cantidad de organismos inicialmente presentes, la eficacia y confiabilidad del agente sanitizante y su correcta aplicación. Un relativamente ineficaz agente necesitará un largo tiempo para reducir el número de sobrevivientes a un nivel de riesgo aceptable.

Si la cantidad de microorganismos presentes afecta el tiempo de esterilización y la eficiencia; es de una clara importancia práctica reducir el número de microorganismos tanto como sea posible antes de intentar aplicar un método de esterilización. Es también esencial eliminar la materia orgánica que protege a las bacterias contra la acción de agentes físicos o químicos por impedir el contacto directo.

El lavado cuidadoso del material, equipo e instrumentos en abundante agua caliente con jabón no elimina todas las bacterias, pero quita la grasa y la suciedad que protegen a las bacterias y reduce efectivamente el número de ellas. Siempre que sea posible debe usarse agua corriente, pero teniendo el debido cuidado que no este lo suficientemente caliente para coagular (desnaturalizar) las proteínas, aproximadamente 60°C y así las bacterias no son simplemente arrastradas con el agua de lavado.

En donde la cantidad de equipo para limpiar es considerable, se usan máquinas lavadoras automáticas a chorro o por aspersión para lograr mejores resultados en un tiempo razonable. La invención de equipos de limpieza ultrasónicos para uso en laboratorios industriales y hospitales ha mejorado las normas de limpieza de instrumentos delicados con molduras y endaduras complicadas, la fuente de energía son ondas sonoras de muy alta frecuencia generadas por reductores selectivos magnéticos este método es conocido como radiación la cual se explica más adelante.

Es muy importante que se distingan los términos esterilización y sanitización; la esterilización por definición es el proceso de eliminación de microorganismos de un artículo, superficie o medio por muerte o eliminación de los mismos. El proceso de sanitización involucra términos como :

Desinfección: consiste en la destrucción de los microorganismos patógenos que pueden producir una infección, se puede realizar por procedimientos químicos o físicos calificándose en el primer caso a la sustancia empleada como desinfectante o germicida.

Antiséptico: este término se reserva normalmente para aquellos desinfectantes químicos que pueden aplicarse sin peligro a la piel o mucosa y se aplican para prevenir una infección, mediante la inhibición del crecimiento bacteriano.

Bacteriostático : Impide el desarrollo de las bacterias. Las sustancias químicas usadas como desinfectantes pueden presentar propiedades bactericidas, es decir, causar la muerte de los microorganismos en un corto periodo de tiempo, pero estas mismas sustancias utilizadas en forma diluida (antiséptico) solamente impiden la multiplicación de aquellos. Esta propiedad es conocida como bacteriostasis, pudiendo los microorganismos permanecer vivos aunque queden inactivos.

En la célula bacteriana los tres sitios principales susceptibles de ser atacados por agentes sanitizantes físicos y químicos son:

Capas superficiales

Enzimas

Material nuclear

Desempeñan un papel importante en este proceso las membranas de las células bacterianas las que, por su permeabilidad, regulan las corrientes de sustancias disueltas hacia adentro y afuera de la célula.

Las enzimas realizan también una fundamental tarea en la evolución metabólica de las células bacterianas; son catalizadores de esos procesos, es decir, aceleran (o retrasan) las reacciones bioquímicas que permiten su desarrollo. Se debe tener presente que las enzimas están constituidas por proteínas, por tanto, cuando se hable de agentes que las desnaturalicen o coagulen, se ha de recordar que las enzimas también son atacadas.

En la materia nuclear de la célula se encuentran los ácidos ribonucleico (ARN) y desoxirribonucleico (AND), que constituyen una central de información, que guarda los datos de cómo deben ser las características de los futuros individuos de esa especie. Si ese material nuclear es atacado, se alterarán aquellos testimonios y, en consecuencia la reproducción normal de la célula. Al no generar, la bacteria morirá sin crear otras nuevas; por consiguiente, se impide el desarrollo o crecimiento y aquello que lo evita es, por definición, un agente sanitizante.

5.1 AGENTES QUÍMICOS

AGENTES TENSOACTIVOS

Entre estos se incluyen los "detergentes" y "agentes remojantes". Contienen una misma molécula un grupo hidrosoluble y otro liposoluble. A estos agentes se les clasifica, por lo general, en catiónicos (aquellos que poseen en sus moléculas cargas electrónicas positivas) y aniónicos (los que, al disociarse, originan un ion con carga electrónica negativa). Cuando las bacterias se ponen en contacto con un agente catiónico, como por ejemplo el cloruro de lauraminio (DG-6), pierden a través de sus membranas, sustancias y elementos que forman parte de ellas, de carga eléctrica contraria, para que luego el detergente penetre en la célula y desnaturalice sus proteínas activas.

La desnaturalización es la modificación de las estructuras de las proteínas causada por enzimas. Como ya sabemos las proteínas tiene una conformación especial, dada por las distintas posiciones de los aminoácidos que, unidos, forman su cadena. A esa disposición le corresponde una distribución especial y concordante de las sustancias que se incorporan a ella para brindarle su alimento (como la glucosa); entonces la desnaturalización es la rotura de algunas uniones o puentes de la cadena de aminoácidos, la que varía su forma, alargándose por ejemplo; eso hace que la otra estructura no embone en la parte deformada y es así como no puede brindarle su alimento y, por ende paraliza su actividad. Las sustancias que coagulan las proteínas actúan de manera similar; la diferencia radica en que la cadena de aminoácidos, en vez de alargarse se hace un nudo y por tanto, tampoco coincide con la estructura que le brinda alimento.

Los detergentes aniónicos (jabones, ácidos grasos) son agentes que, al disociarse, producen un ion carga negativa y actúan por lo general sobre las células desorganizando sus membranas y alterando todo el metabolismo de la bacteria.

Fenoles: El ataque inicial de los fenoles se localizan en la membrana celular y es seguido por su interacción con las proteínas, a las que desnaturaliza.

Los ácidos, álcalis, el alcohol, la acetona y otros disolventes orgánicos actúan primariamente desnaturalizando las proteínas activas.

Los agentes mercuriales y arsenicales, la plata, el formol, los detergentes aniónicos, los colorantes ácidos y básicos y los compuestos amónicos cuaternarios, están ligados con distintos grupos reactivos (sulfhidrilos), que se encuentran en la molécula proteica y son esenciales para su actividad. La fuerza de la unión es la que determina su reversibilidad, o si el efecto total es bactericida o bacteriostático.

Tanto la materia orgánica como aquellas otras sustancias que contienen grupos reactivos libres (SH) en combinación con las proteínas activas, enzimas, reducen en forma notable la eficiencia de los agentes cuyo efecto tóxico se debe, justamente, a la combinación de estos dos grupos.

Los grupos SH reaccionan con los OH de la glucosa, desprendiéndose moléculas de H₂O y se establece así la unión con la glucosa (alimento). Los metales pesados: cobre, mercurio, etc., actúan interfiriendo en la conexión existente entre la proteína (enzima, grupo sulfhidrilo) y la glucosa. Al unirse estos elementos al grupo sulfhidrilo de la enzima, no se produce la conexión con la glucosa; si no que se interrumpe el metabolismo.

Agentes oxidantes: los principales entre éstos son los halógenos, el agua oxigenada y el permanganato de potasio. Estos compuestos oxidan a los grupos reactivos esenciales de las moléculas proteicas, alternando por lo tanto, sus funciones vitales. El agua oxigenada y el permanganato de potasio poseen fuerte acción oxidante, pero son neutralizados y reducen su eficacia de un modo notable al contacto con materia orgánica inerte de naturaleza reductora.

Colorantes: Por lo general inhiben el desarrollo de las bacterias a grandes diluciones y ha sido demostrada su acción sobre las proteínas del núcleo.

Formaldehídos: Cuando se usan en concentraciones suficientes, destruye a todos los microorganismos, incluso las esporas. Al unirse con los grupos tóxicos de las toxinas bacterianas como las de la difteria y el tétanos, destruye la toxicidad de estas sustancias sin anular las propiedades antigénicas (caracteres de la formación de anticuerpos usados en la fabricación de vacunas).

Oxido de etileno: Es un agente por lo común usado en la esterilización gaseosa y forma una combinación irreversible con las moléculas proteicas que destruye las bacterias.

Quimioterápicos y antibióticos: Si bien los quimioterápicos y antibióticos actúan como bacteriostáticos en unos casos y bactericidas en otros, según su tipo o concentración.

5.2 AGENTES FÍSICOS

Las bacterias como sabemos se encuentran en cualquier lugar y latitud, en las grandes profundidades del mar, en aguas termales próximas a ebullición: algunas se desarrollan a temperaturas poco menos de congelación; muchas mueren por desecación o a causa del vacío, pero ninguno de estos métodos es eficaz como proceso de esterilización, porque no todos los organismos mueren.

La eficacia de los rayos X y de otros materiales radioactivos es importante, ya que éstos destruyen a todos los microbios.

La exposición de las bacterias a altas temperaturas tiene especial valor, puesto que constituye el más adecuado método de esterilización. Los microorganismos no mueren en forma instantánea condicionadas de esta manera, pero su muerte sí se ocasiona al someterlas a la llama de un mechero.

El tiempo requerido para esterilizar un objeto depende del número de microbios que contenga o hay sobre él, porque no todas las bacterias ofrecen la misma resistencia al calor; como la esterilización significa producir la muerte de todos los microorganismos, cuantas más bacterias haya, mayor será el tiempo que de seguridad al respecto.

El calor excesivo coagula el protoplasma y desnaturaliza las enzimas esenciales, matando, de esta manera, los microorganismos. En presencia de agua, las proteínas se coagulan cuando están bien hidratadas a temperaturas más bajas, y en consecuencia, el proceso se acelera. Por esta razón, actuando a la misma temperatura, el vapor a presión resulta un agente esterilizador rápido que el calor seco (aire caliente).

Rayos ionizantes: Las radiaciones son admitidas como agente sterilizador, porque los ácidos nucleicos que originan el material genético de los núcleos celulares absorben los rayos. Con una longitud de onda adecuada y una cantidad tal de energía radiante, se producen formas mutantes, es decir, incapaces de reproducción.

Ultrasonido: Las vibraciones sónicas de alta frecuencia en los límites superiores audibles y en la región supersónica resulta fuertemente destructiva para las bacterias y otros organismos unicelulares en suspensión líquida. La descomposición celular se origina quizás a causa de la formación y rotura de burbujas de gas en el interior de la célula.

Filtros: Son utilizados, por ejemplo, como método para eliminar bacterias y otros microorganismos mayores del suero sanguíneo; en realidad, este procedimiento no coacciona la destrucción de la bacteria, sino que su separación es un filtrado y por lo tanto, no constituye una técnica segura de esterilización.

CITAS TEXTUALES

- 9.- CASTAÑEDA, Eriberto Ing., M. en C. Alba Medina Mayer, Curso: Evaluación y Validación de Sistemas Críticos en Areas Asépticas, Asociación, Farmacéutica Politécnica A.C. México 1988.
- 17.- GUÍA de Prácticas Adecuadas de Manufactura para Cuartos Limpios CIPAM, Monografía Técnica No. 1, México 1990
- 18.-GUÍA Oficial de Validación de S.S.A. "Areas asepticas, hornos y autoclaves" México, D.F. 1990 pág. 2-21
- 20.- GUÍA Oficial de Validación de la S.S.A. "Filtros Asépticos y Sistemas de Generación de Aqua Calidad Inyectable" México 1991 pág. 3 - 12
- 28.- MARTÍNEZ, M. Martha L. Ma. de los Dolores Campos E., Curso : Procesos de Sanitización y su Validación, Instituto Mexicano de Capacitación de la Industria Farmacéutica y Química Farmacéutica, México 1997

CATITULO VI

VI. ESTERILIZACION

6.1 FUNDAMENTO

La esterilización es, por definición, el proceso de eliminación de microorganismos de un artículo, superficie o medio, por muerte o eliminación de los mismos. En un laboratorio de microbiología existen diferentes medios para conseguir esta finalidad. Los aparatos se esterilizan normalmente por aplicación de calor, en forma húmeda o seca. En cuanto a la preparación de medios de cultivo hay que tener en cuenta que los microorganismos se encuentran en cualquier parte y por lo tanto en artículos o materiales que normalmente se emplean en los métodos de esterilización. Los medios preparados por tanto se someterán en últimas instancias a la esterilización por calor húmedo o por filtración, en otros casos la esterilización se lleva a cabo con el uso de desinfectantes químicos, por radiación o por gases.

En un sistema de eliminación de microorganismos es necesario considerar tres aspectos:

a) El objeto o sustancia, donde se debe considerar :

- 1.- Termolabilidad (cuando es posible usar temperaturas mayores a la ambiental).
- 2.- Superficie del objeto (áspera, lisa, etc.).
- 3.- Tamaño.
- 4.- Permeabilidad (en este caso, la temperatura debe ser uniforme en todos los puntos del material).
- 5.- Acondicionamiento del material.

b) Forma biológica. Se trata de la eliminación de toda forma biológica, vegetativa o esporulada.

c) Sistema de eliminación, que se divide a su vez en dos; físicos y químicos:

Se deben emplear los distintos sistemas, en las condiciones que uno de ellos requiere. Tanto el método de vapor de agua a saturación y presión atmosférica superior a la normal, como el de calor seco, hay que utilizarlos a las temperaturas y tiempos de exposición correspondientes. Cuando la naturaleza o composición del material por esterilizar lo exija, podrán usarse los métodos de pasteurización, tyndalización y vapor fluente.

El sistema de agua en ebullición podrá utilizarse sólo como técnica de desinfección de emergencia (como motivo de los riesgos e inseguridades que su uso implica).

6.2 TÉCNICAS Y/O TIPOS

MÉTODOS FÍSICOS

Calor Húmedo	Pasteurización
	Ebullición
	Vapor de Presión atmosférica
	Vapor sometido a Presión
Calor Seco	Flameado
	Incineración
	Aire caliente
Filtración	Bujías (tierra de diatomeas, porcelana)
	Asbesto
	Discos de membrana
Radiaciones:	No ionizantes
	Rayos Ultravioleta
	Rayos Infrarrojos

Ionizantes

Rayos gamma

Neutrones de alta energia

6.3 MÉTODOS FÍSICOS

El calor aplicado a temperaturas adecuadas y durante un correcto periodo de tiempo constituye el más importante medio de esterilización de que se dispone. Algunos materiales resultan alterados por el calor, pero en este caso la modificación del ciclo utilizando una temperatura más baja durante un periodo de tiempo más prolongado soluciona este problema y debe ser el método a utilizar en vez de emplear otros más complejos o menos eficaces.

Cuando se emplea el calor, el principal factor que afecta el proceso es la presencia o ausencia de humedad que determina la temperatura exacta a la que los microorganismos mueren. Aquellos que se encuentren en una atmósfera húmeda y sometidos a una temperatura elevada morirán cuando se produzca la coagulación de sus proteínas. La acción letal del vapor proviene del calor latente liberado cuando se condensa en una superficie fría aumentando de esta manera la temperatura de la zona enfriada. La destrucción de las esporas bacterianas sigue un comportamiento similar, en tanto que el vapor se condensa en la pared de la spora y aumenta su contenido en agua que finalmente hidroliza y degrada el contenido proteico. En atmósfera seca, completamente exenta de humedad, las bacterias como muchas proteínas son más resistentes al calor y no mueren hasta que tiene lugar la oxidación de sus componentes, lo cual ocurre a temperaturas mucho más elevadas que las que se requieren para la coagulación de las proteínas.

6.3.1 CALOR HÚMEDO

PASTEURIZACIÓN

Los microorganismos tales como *Brucelas* y *Salmonelas* que se encuentran entre los agentes de enfermedades transmitidas por la leche y el bacilo de la tuberculosis son dos ejemplos que mueren fácilmente por este procedimiento.

Hay dos métodos de uso común:

- a) Proceso de mantenimiento que eleva la temperatura de la leche a 63°C (145°F) por un periodo total de 30 minutos.
- b) Se eleva la temperatura de la leche a 72°C (161°F) durante 15-20 segundos y se conoce como proceso instantáneo.

Se conoce como método de comprobación de una pasteurización adecuada la prueba de azul de metileno y de la fosfatasa. En los laboratorios donde se manejan y/o preparan líquidos tales como sueros se emplea una modificación de la pasteurización y es conocida como esterilización a baja temperatura. Consiste en la exposición de los productos durante varios días sucesivos a temperatura de 56°C durante 1 hora con lo que se destruyen las formas vegetativas pero no las esporas si estuvieran presentes.

Las vacunas pueden tratarse por exposición a 60° C durante 1 hora ya que periodos más largos a más altas temperaturas pueden interferir el poder de inmunización de las mismas. Los aparatos provistos de termostato para mantener ciclos de 10 minutos a 75°C se emplean así mismo para lograr la desinfección de algunos instrumentos que puedan resultar dañados cuando se les someten a ebullición.

EBULLICIÓN

No está reconocido como método oficial de esterilización y, por otra parte, no brinda ninguna seguridad al respecto. Esta técnica consiste en introducir instrumentos, en un recipiente con agua hirviendo a 100 °C.

La temperatura de 100 °C mata todas las formas vegetativas o no esporuladas en un tiempo de 10 minutos. A esta misma temperatura la mayoría de las esporas mueren en 30 minutos pero algunos son capaces de resistirla durante varias horas. El poder desinfectante del agua aumenta notablemente con la adición de 2 % de carbonato sódico, habiéndose demostrado que esporas que resistieron 10 horas en agua hirviendo murieron a los 30 minutos con la adición de dicho producto. Este método es útil para desinfectar algunos instrumentos, piezas pequeñas de vidrio y algún material que deba ser empleado de modo inmediato. No es un procedimiento adecuado para el instrumental que haya de almacenarse en condiciones estériles.

Las sales disueltas en agua aumentan su punto de ebullición, por ejemplo, el agua con carbonato de potasio hierve a 135 °C, con cloruro de calcio a 179 °C, etc., sin embargo, estas propiedades del agua con agregados de sales no se recomienda ni se aprovecha en la eliminación de gérmenes por ebullición porque se precipitan sobre los instrumentos metálicos, originando fácilmente su corrosión y/o deterioro del filo. Sólo el borato y el benzoato de sodio tienen la misma propiedad del carbonato y carecen de inconvenientes.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

VAPOR A PRESIÓN ATMOSFÉRICA

Los esterilizadores como los de Koch o Arnold, se encuentran hoy en día superados por el uso de autoclaves. Si se desea utilizar el vapor a 100 °C como agente esterilizante puede emplearse el autoclave dejando en este caso la tapa sin apretar. De esta manera actúa como vaporización. Con una exposición de una hora y media normalmente queda asegurada la esterilización de un agar o un caldo nutritivo. En aquellos casos en que los componentes de un medio quedan desnaturalizados por el empleo de calor a 100 °C se recurre a la aplicación de modo intermitente, proceso conocido como tindalización, en tres días consecutivos. Aunque es preciso tener presente que la tindalización solamente es efectiva cuando el medio que se esterilice es adecuado para la germinación de esporas. Sin embargo no se consigue la destrucción de los esporulados anaerobios a menos que la incubación se realice en anaerobiosis, ni la de gérmenes termófilos.

VAPOR SOMETIDO A PRESIÓN

Cuando el vapor contiene gotitas de agua en suspensión recibe el nombre de <vapor húmedo>. En ambiente húmedo, a temperaturas relativamente bajas destruyen a los microorganismos; 121 °C durante 15 minutos de exposición al vapor bajo presión equivalen en su efecto a 160 °C durante 20 minutos expuesto a calor seco. Para una esterilización confiable se requieren temperaturas superiores a 100 °C durante un tiempo equivalente. El vapor a presión como se utiliza en las autoclaves tiene propiedades físicas que permiten la rápida penetración en objetos porosos y de tela, así como la esterilización de instrumentos y objetos sólidos. Es el método más común y más confiable de esterilizar un gran número de objetos.

PROPIEDADES FÍSICAS DEL VAPOR

Calor latente. La temperatura de 1 g de agua se eleva 1 °C por una caloría. Se requieren 80 calorías para elevar la temperatura de 1 g de agua a 20 °C al punto de ebullición (100 °C). Se requieren 524 calorías para convertir 1 g de agua a 100 °C en 1 g de vapor a la misma temperatura. Estas 524 calorías son almacenadas en el vapor como calor latente. El calor latente es transferido a un objeto que va a ser esterilizado por la condensación sobre la superficie más fría como una película de humedad, desprendiendo y transfiriendo el calor instantáneamente. Este proceso continúa hasta que el objeto que se esteriliza esté a la misma temperatura que el vapor; entonces principia el tiempo de exposición para la esterilización. El vapor es capaz de penetrar materiales porosos muy rápidamente en el supuesto de que no lo impidan envolturas inadecuadas o de que el aire no quede atrapado en las telas o en los instrumentos huecos.

Mezcla aire/vapor. El aire y el vapor se mezclan por difusión lenta. Cuando el vapor se introduce en un autoclave que ya contiene aire, siendo el aire más pesado (densidad 0.12) y más frío que el vapor (densidad 0.07) quedará en el fondo del autoclave donde la temperatura es significativamente más baja. La eliminación del aire durante el ciclo de esterilización es importante por dos razones. El aire que queda en el centro de un paquete, o en una cánula angosta, impedirá que el vapor tome contacto directo con el centro del paquete o en la luz del centro de la cánula. Si no hay contacto, la esterilización fracasa. En segundo lugar, el aire mezclado con el vapor reduce la temperatura de éste. Por ejemplo, cuando en un autoclave se usa una presión tipo de vapor de 25 lb/plg², la relación de aire eliminado temperatura/tiempo requerida para la esterilización, se muestra en la siguiente tabla:

TABLA 3

Aire eliminado	Temperatura	Tiempo de Esterilización
Ninguno	115 °C	No mueren esporas
1/3	121 °C	15 minutos
2/3	126 °C	12 minutos
Completo	132 °C	3 minutos

Vapor a presión. El aumento de presión del vapor en ausencia de aire incrementa la temperatura. La temperatura del vapor a 15 lb/plg² es de 121 °C, a 20 lb/plg² es de 126 °C y a 30 lb/plg² es de 134 °C.

Calidad del vapor. El vapor empleado para la esterilización debe tener características precisas y se describe como vapor seco, vapor saturado, en fase limitante entre vapor y agua.

CICLO DE ESTERILIZACIÓN

Existen varios factores que influyen en la determinación de un ciclo de esterilización que son los siguientes:

Tiempo de generación del calor. Representa el tiempo que se precisa para que el calor penetre de modo completo en cada artículo que compone la carga del aparato y que será un periodo mucho más dilatado que el necesario para que en la cámara del autoclave se alcance la temperatura de esterilización. En el caso de productos líquidos la penetración depende de la conductividad del calor a través de las paredes del recipiente y si contiene agar como medio de cultivo será sin duda más prolongado que si es caldo nutritivo. Un factor adicional que influye en la penetración del calor es el ritmo al que la cámara del autoclave la temperatura de esterilización, cuando más lento sea, mayor es la posibilidad de que la cámara y la carga alcancen la temperatura de modo simultáneo.

Tiempo de permanencia. Es el tiempo necesario para que todos los microorganismos, en forma vegetativa o esporulada, mueran a la temperatura empleada. Los productos con pH bajo (5.0) o alto (9.0) se esterilizan con más facilidad que los que tienen valores intermedios.

Tiempo de seguridad. Es el tiempo extra añadido como factor de seguridad, normalmente la mitad del tiempo de permanencia, siendo la suma total el tiempo de esterilización o ciclo.

Ciclo de esterilización en autoclaves:

Medios de cultivo (caldo)	115 °C durante 15 minutos
Medios de cultivo (agar)	121 °C durante 15 minutos
Cultivos infectados	126 °C durante 15 minutos
Paquetes, cristalería, instrumentos	126 °C durante 15 minutos
Paquetes, cristalería, instrumentos	134 °C durante 4 minutos

CONTROL DE ESTERILIZACIÓN

Pruebas microbiológicas. Las esporas de microorganismos del grupo *Bacillus* se emplean para determinar la efectividad de la esterilización por calor húmedo siendo empleada la especie *B. stearothermophilus*. Se trata se un termófilo con una temperatura óptima de crecimiento de 55-60 °C y sus esporas requieren una exposición de 12 minutos a 121 °C para su muerte. Se impregnan tiras de papel con esporas en número de 10⁶, se secan a temperatura ambiente y se colocan en sobres de papel que se reparten en distintos lugares de la carga a esterilizar. Tras el proceso de esterilización se inoculan en un medio adecuado y se incuban para comprobar la esterilidad a 55 °C durante 5 días.

Indicadores químicos. Los indicadores químicos son muy adecuados y proporcionan una indicación rápida del grado de eficacia de la esterilización apreciable por un cambio de coloración basado en la combinación segura de tiempo y temperatura. Los tubos que contienen los indicadores se llaman tubos de Brown y el color de los mismos cambia de modo similar al de los semáforos: rojo peligro, amarillo precaución y verde. seguridad. Existen varios tipos que cubren los distintos rangos de los diversos ciclos de esterilización siendo los empleados para autoclaves los siguientes:

Núm. 1 (negro) para el uso con esterilizadores ordinarios de vapor a temperaturas de 126 °C y menores.

Núm. 2 (amarillo) para usar en esterilizadores de alto vacío y con temperaturas superiores a 126 °C.

Tiras para autoclaves. Es una cinta que se emplea para cerrar cajas y paquetes con material que van impregnadas en un colorante que cambia del blanco a diferentes tonalidades del marrón hasta el negro de acuerdo con el grado de calentamiento que ha sufrido. Es útil como indicador de que un artículo ha sufrido un proceso de calentamiento pero no debe emplearse como control de esterilización.

Todo proceso de esterilización requiere que los materiales sean preparados y acondicionados según el método por emplear. Por tanto los elementos que se someterán a este proceso serán previamente lavados y cepillados, para remover toda sustancia extraña que les haya quedado adherida. Los mismos deben estar libres de partículas de grasa u otra materia que englobe en su interior microorganismos o sus esporas, sobre los que el vapor del agua, al estar protegidos, no ejercería su acción.

Los materiales estarán preservados por envolturas de papel o tela (paquetes) o, si no, por cajas.

En todos los casos se debe tener la precaución de que el vapor penetre hasta la parte más interna del paquete o de la caja.

Las envolturas protectoras de papel deben ser permeables al vapor y estar dispuestas en doble capa; se recomienda usar una primera de tela y una segunda de papel. Todo elemento que ha de esterilizarse tiene que estar rotulado en forma adecuada, con el propósito de identificar con facilidad el contenido del paquete.

6.3.2 CALOR SECO

El calor seco se transfiere desde la carga por conducción o por radiación. Se requieren temperaturas altas y un tiempo de exposición comparativamente alto. Estos dos hechos explican por qué no es un método de esterilización adecuado para malos conductores del calor. Es, sin embargo, el método de elección para piezas metálicas finas, como agujas, y para jeringas de vidrio entre otros, el calentamiento por conducción asegura la esterilización del interior. También se utiliza para preparaciones oleosas y en polvo. El tiempo de exposición esterilizante se mide siempre desde el momento en que el centro de la carga alcanza la temperatura requerida; éste varía según el volumen de la carga y el tipo de material sometido al proceso y necesita un control cuidadoso y verificación del aparato.

FLAMEADO

El calor proveniente de la llama de un mechero bunsen se emplea para esterilizar asas de platino para siembra, las puntas de las pinzas y las espátulas, objetos lisos, varillas de vidrio, bocas de tubos o frascos, lancetas, tec. Las asas que tengan material infeccioso proteico deberán sumergirse para su lavado en un desinfectante antes de someterlas a la acción de la llama con el fin de evitar la diseminación de posibles partículas infectantes por salpicaduras.

De manera alternativa puede disponerse de un mechero protegido con una campana de cristal para retener cualquier partícula que salte del asa. Se esterilizan pasándolos 3 ó 4 veces con lentitud por la llama .

INCINERADO

El uso de incineradores electrónicos o alimentados con gas provistos de unidades de ventilación forzada representa un excelente medio de destrucción de artículos tales como material y ropas sucias, materiales de plástico como el PVC y el polietileno, pero el material poliestireno como el de las placas de cultivo es recomendable utilizar otro método.

AIRE CALIENTE

La esterilización por aire caliente tiene gran aplicación, se utiliza para el material de vidrio, como pipetas, cajas Petri, etc. Ciertos productos farmacéuticos, como la parafina líquida, las sulfonamidas y los productos en polvo. Para este método se utilizan las estufas y los hornos eléctricos.

Cuando se seleccionen los artículos que se han de someter a esta esterilización se debe tener presente que las temperaturas de 160-180 °C que se emplean pueden carbonizar ciertas estructuras así como destruir las gomas y cauchos y algunos plásticos. El aire caliente es un mal conductor del calor y en las condiciones en que se realiza la esterilización penetra con lentitud. El tipo de esterilizador convencional de aire con los elementos calefactores en las paredes debe estar provisto de deflectores para asegurar una distribución homogénea del aire y eliminar las bolsas del mismo que pudieran formarse. Se evitará la sobrecarga y el material se colocará de tal manera que se permita la libre circulación del aire entre todos los artículos individualizados que se pretende esterilizar.

Es preciso considerar una serie de factores cuando se determine la temperatura y el tiempo necesario para realizar una esterilización por aire caliente. Se habrá conseguido una esterilización de una carga cuando cada artículo que componga la misma se halle libre de gérmenes esporulados y no esporulados. El tiempo necesario para que el calor penetre en cada artículo se denomina tiempo de penetración del calor y el necesario para asegurarse de que todas las esporas han muerto reciben el nombre de tiempo de mantenimiento, constituyendo el tiempo total, un ciclo de esterilización resultante de la suma de los anteriores más un tiempo aproximadamente igual a la mitad del de mantenimiento (factor seguridad) hasta cuya finalización no debe abrirse el aparato esterilizador. Para material de vidrio de laboratorio e instrumental se considera como tiempo de esterilización una hora a 160 °C . Si existe alguna duda sobre el tiempo de penetración necesario para los contenedores metálicos deberá prolongarse el tiempo hasta una hora y media. Con esta temperatura y estos tiempos los tapones de algodón y los hisopos con mango de madera no sufren alteraciones.

Para material de vidrio e instrumentos no cortantes puede emplearse un ciclo de esterilización de 180 °C durante 30 minutos sin embargo no se recomienda para el material tapado con algodón ya que puede carbonizarse dejando libres ácidos grasos bactericidas. Un tiempo de esterilización de 2 horas a 150 °C se prefiere para instrumentos cortantes.

La Farmacopea Británica aconseja como tiempo de mantenimiento para la esterilización en seco, de aceites, glicerina y polvos una hora a 150 °C. A este tiempo hay que añadir el necesario para la penetración del calor en los materiales, más el periodo de seguridad.

Para controlar la eficacia de la esterilización por calor seco se emplea como prueba biológica, el comportamiento de esporas de una cepa no toxigénica de *Clostridium tetani*. Se preparan tiras de papel impregnadas con esporas en número de 10⁶, se introducen en sobres y se colocan en paquetes adecuados, o bien se prepara un paquete con una jeringuilla y un recipiente de aluminio adecuado. Las impregnadas se colocan entre la cubeta y el émbolo y todo el conjunto se acondiciona para la esterilización. Las tiras se siembran en tioglicolato o medio de carne y se procede a la incubación en las más estrictas condiciones de anaerobiosis a 37 °C durante 5 días.

El tubo de Browne para control de rutina de la esterilización por calor seco se considera de gran conveniencia. Un ciclo satisfactorio produce un cambio de coloración en el tubo, a verde, después de estar sometido a 160 °C durante 60 minutos o a 150 °C durante 115 minutos .

Los elementos que son sometidos a este tipo de esterilización, deben protegerse asépticamente con cajas metálicas, tubos de metal con tapas del mismo material, tubos de vidrio con tapones de algodón, recipientes de vidrio, envolturas de papel, etc.

6.3.3 FILTRACION

La eliminación de microorganismos de un líquido mediante filtración puede efectuarse por varios métodos y tiene una gran aplicación en la industria farmacéutica y en los laboratorios microbiológicos.

Se usa en especial para eliminar gérmenes de sustancias líquidas, que no resisten altas temperaturas sin descomponerse. En realidad no puede considerarse este método como de segura esterilización; pese a ello, se le incluye para dar una idea de su funcionamiento.

Este sistema se fundamenta en la detención de los microorganismos al efectuarse el pasaje de los líquidos a través de una sustancia porosa, a la que sólo traspasan el líquido y partículas ultradiminutas. Las fuerzas utilizadas pueden ser las generadas por simple gravedad, la aplicación de una presión positiva o un vacío, o aun la fuerza centrífuga.

Existen tres tipos generales de contaminantes que se deben considerar: Impurezas disueltas, microorganismos y partículas en suspensión.

Entre los contaminantes disueltos se incluyen tanto las impurezas inorgánicas (iónicas) como las orgánicas. Las sales inorgánicas que pasan a las aguas de abastecimiento provienen del suelo, rocas, tanques, cañerías, etc. Entre los compuestos orgánicos se incluyen las ligninas, táninos, detergentes, polisacaridos, proteínas y otros productos de descomposición biológica. El agua es la mayor fuente de impurezas disueltas. Los microorganismos constituyen un problema, tanto vivos como muertos. Cuando vivos, pueden multiplicarse en forma logarítmica. Cuando muertos, constituyen fuentes de pirógenos, y pueden conducir a abscesos estériles y aglomeración de partículas.

Las partículas incluyen sólidos coloidales, metal, asbesto, algodón, polvo, hilazas y una infinidad de variedades de otros sólidos contaminantes, incluyendo los microorganismos.

Los aparatos de filtración actualmente disponibles tienen un tamaño de poro en micrómetros y están diseñados para retener la mayoría de los virus más pequeños. Los métodos de filtración son especialmente de utilidad para antibióticos en solución, líquidos termolábiles como los sueros así como para ciertas soluciones de carbohidratos que se emplean en la preparación de medios de cultivo.

La filtración es así mismo un método útil para la recuperación, a partir de filtros exentos de bacterias, de toxinas y bacteriófagos.

Existen muchas técnicas de filtración, desde la utilización de las antiguas bujías filtrantes hasta los modernos filtros de membrana. Cada uno tiene su aplicación específica y es importante tener en cuenta que los filtros considerados como esterilizadores están diseñados para retener bacterias pero los virus pueden pasar a través.

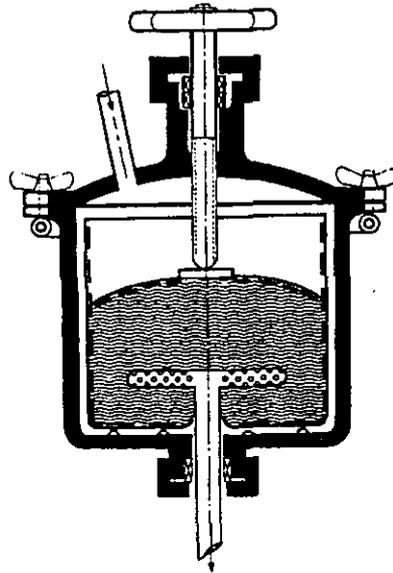
Sólo mencionaremos algunos de los tipos de filtración, según su importancia y uso.

BUJÍAS

Son filtros en forma de cilindro hueco, abiertos sólo en un extremo, con paredes de espesor variable, que pueden ser de tierra de infusorios calcinados o tierra de diatomeas (tipo Berkefeld y Mandler), los Berkefeld son de origen alemán; existen tres grados : V viel (groceros), N normal y W wenig (fino), que están determinados por el paso de agua a través de ellos bajo presión estándar. Los filtros de grado V se utilizan para la "clarificación" de líquidos principalmente pero no son lo eficientemente finos como para esterilizarlos por retención de las bacterias.

Los filtros de bujía americanos Mandler están hechos a base de kieselguhr-asbesto y yeso de Paris. Los tres grados vienen determinados por la presión de aire que son capaces de soportar sin que el agua filtre a su través.

FIGURA 12



Los filtros Mandler funcionan de la siguiente manera:

- a) el cultivo o el material que debe filtrarse se vierte en la camisa de vidrio (1) y cuando la bujía (2) queda, por entero; cubierta, comienza la aspiración. El líquido pasa a través del filtro, las bacterias quedan retenidas y el filtro libre de los microbios fluye hacia el frasco estéril inferior.
- b) sección del filtro que muestra la forma hueca de la bujía.

FILTROS DE PORCELANA

Los tipos más corrientes de filtros son los Chamberland, un filtro francés hecho de arena y caolín, y el filtro inglés de Doulton. Los primeros se construyen con porosidades variables con arreglo a las cuales se clasifican en grados, L1, L1a, L2, L3, L5, L7, L9 Y L11. El L1, es un filtro clarificante equivalente al V de berkefeld y el resto son esterilizantes.

Los grados de las bujías filtrantes de Dilution son P2, P5 y P11 siendo las dos últimas esterilizantes. Para su utilización, la bujía se monta en un tapón de caucho de silicona y se efectúa la filtración de adentro hacia afuera.

DISCOS FILTRANTES DE ASBESTO

Los discos de asbesto o filtros Seats se preparan con asbesto tipo crisol que resulta más adecuado para filtración y está compuesto de silicato de magnesio. El disco está adaptado a una montura metálica, ajustado con al superficie rugosa hacia arriba asegurándose que la rejilla metálica de soporte se halla en correcta posición. El filtro Seats se adapta a un frasco de vacío mediante un tapón de caucho de silicona. Los tapones de caucho tienden a vulcanizarse con el calentamiento pero los de silicona resisten repetidas veces la acción del autoclave. La parte del frasco que recibe el filtro se rellena de algodón no absorbente y el filtro se envuelve en papel y se esteriliza en el autoclave.

Después de su empleo se esteriliza si se ha contaminado, se retira el disco de asbesto y se limpia la montura metálica, se coloca un nuevo disco y se somete a la esterilización en autoclave. Los discos de asbesto tienen distintos grados:

TABLA 4

GRADOS DE DISCOS DE FILTROS CARLSON-FORD PARA ESTERILIZACION	
HP PYR	Para la eliminación de agentes pirógenos
HP EKS2	Para eliminación de microorganismos de líquidos fuertemente infectados.
HP EKS	Para esterilización total utilizando condiciones estándar de control.
HP EK	Para lograr esterilidad contra <i>Serratia marcescens</i> (<i>Chromobacterium prodigiosum</i>).

El prefijo HP designa grado de alta pureza.

FILTROS DE VIDRIO SINTETIZADO

Estos filtros están fabricados con vidrio finamente molido y seguidamente fundido para conseguir la adherencia de las partículas. Están hechos según las especificaciones del British Standard (BS 1752) que señala la cantidad y tamaño del poro.

Existen los siguiente grados:

TABLA 5

Porosidad	Tamaño de poro (micras)
Núm. 00	200-500
0	150-200
1	90-150
2	40-90
3	15-40
4	5-40
5 sobre 3	0.7-3

El grado 5 generalmente va sostenido por un disco de porosidad de grado 3 y se denomina filtro de vidrio sintetizado 5/3 .

La mayoría de los filtros de uso en la actualidad llevan una unión de vidrio esmerilado para su adaptación a los frascos o a tubos como prolongación lateral, es recomendado untar las uniones con silicon fluido como lubricante entre las piezas. Antes de su colocación en el esterilizador los discos deben de estar secos. El vidrio sintetizado no debe exponerse a temperaturas superiores a 200 °C. cuando se utilicen presiones negativas no deberán sobrepasar, para los discos mayores, los 300 mm de Hg, pudiendo tolerar hasta 400 mm, no obstante deberán evitarse presiones elevadas.

FILTROS DE MEMBRANA

Los filtros de membrana han sustituido a otros filtros, y actualmente se fabrican de celulosa o de sus éteres (nitrato o acetato de celulosa) sobre un soporte de celulosa regenerada. Entre sus ventajas tenemos las siguientes:

- a) Facilidad en el manejo, son relativamente ásperos.
- b) Son lo suficientemente baratos como para utilizarlos una sola vez.
- c) Eléctricamente neutros las moléculas cargadas no se separan tan fácilmente se las soluciones como con otros filtros.
- d) Retención mínima del soluto.
- e) Exactitud en los grados de tamaño de poro con una amplia escala de los mismos.

Las porosidades están comprendidas entre 10 micrómetros y 5 nm. Tienen forma de discos y cada tipo retiene en su superficie todas las partículas bacterianas y celulares cuyas dimensiones excedan el tamaño del poro. Colocando el disco sobre la superficie de un medio de cultivo adecuado se consigue el crecimiento de las bacterias retenidas en aquél. Se han diseñado diferentes tipos de soportes con el fin de adaptar los discos a los equipos de tipo Seitz, de vidrio o de metal. Es importante evitarse temperaturas por encima de 121 °C pues se deterioran. Si durante la esterilización se precisa utilizar el vacío debe procederse a su aplicación de manera lenta y no en un tiempo prolongado para evitar la rotura del filtro.

6.3.4 RADIACIONES

De las diversas clases de radiaciones que se utilizan con propósito de esterilización caen en dos grupos que difieren entre sí, tanto en su naturaleza como en su magnitud de energía.

En un grupo están los rayos infrarrojos y los ultravioleta que son del tipo de baja energía no ionizante. Los rayos gamma y los electrones de alta energía están en el otro grupo y son los del tipo ionizante.

RADIACIONES NO IONIZANTES

Los tipos de radiaciones no ionizantes son rayos electromagnéticos (es decir, no partículas) de longitud de onda mayor que la luz visible y que en una gran proporción se absorben como calor.

Los rayos infrarrojos son otra forma de esterilización por calor donde los microorganismos mueren por oxidación por consecuencia del calor generado. La radiación ultravioleta se absorbe por las proteínas y los ácidos nucleicos y causa la muerte de los gérmenes por las reacciones químicas que tienen lugar en el núcleo y en otros componentes de la célula. El poder de la penetración de las radiaciones UV es muy bajo. La media de la longitud de onda se expresa en nanómetros siendo las de actividad bacteriana del orden 240-280 nm mostrando la mayor eficacia las de 250-265 nm.

RADIACIÓN INFRARROJA

Es un método muy adecuado para la esterilización de gran cantidad de instrumentos de vidrio del laboratorio en poco tiempo, estos se introducen en contenedores metálicos y se disponen sobre una cinta transportadora que pasa a una cámara aislada donde se expone a la radiación infrarroja que alcanza temperaturas de 190 °C durante 10 minutos. Considerando el tiempo necesario para alcanzar la temperatura adecuada y el de enfriamiento, la duración total del proceso no es superior a 30 minutos. Para tener la seguridad que todos los artículos alcanzan la temperatura correcta, el grado de absorción de calor en los contenedores de gran tamaño mediante su anodizado en negro mate y los más pequeños en gris.

Este proceso se puede controlar con indicadores como los tubos de Browne tipo IV (punto azul). Con un tiempo de 12 minutos a 180 °C o de 6 minutos a 190 °C se produce un cambio de color del rojo al verde.

RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

La aplicación de la radiación ultravioleta como agente esterilizante tiene su empleo con objeto de lograr la reducción del número de bacterias en aire, agua o en superficies contaminadas. No es un agente esterilizante muy adecuado pues tiene poco poder de penetración especialmente en atmósferas con excesiva cantidad de polvo o en aguas sucias. Las sales de hierro disueltas tienen también una influencia negativa en la penetración de las mismas radiaciones, en tanto que otras sales no muestran tal efecto negativo.

Todas las formas bacterianas, los virus y la mayor parte de los mohos son sensibles a las radiaciones UV por debajo de 300 nm. Respecto a los protozoos y las algas son así mismo destruidas o bien se consigue la disminución de su ritmo de crecimiento.

La radiación ultravioleta de la luz del sol posee una longitud de onda de 290 nm, pero las longitudes más eficaces son más cortas produciéndose por lámparas de vapor de mercurio con emisión a 240-280 nm. La energía de los fotones producidos (paquetes de energía radiante) es del orden de 5 eV (1 eV representa el trabajo producido para acelerar un electrón en un campo electrónico con diferencia de potencial de 1 voltio) por lo que tiene una capacidad muy baja de excitar las moléculas. La potencia de la luz ultravioleta se expresa en vatios referida como la cantidad de la misma producida a 1 metro de distancia de la fuente. La intensidad de la lámpara se expresa en microwatios/cm² y multiplicando la intensidad por el tiempo de exposición nos da la medida en microwatios-segundo/cm². La dosis esterilizante de luz ultravioleta es el número de microwatios-segundo/cm² necesarios para producir la muerte de un determinado número de microorganismos.

La dosis que se requiere para matar el 99.9 % de *Escherichia coli* es de 12.000 microW.s/cm², en caso de las esporas de *Bacillus subtilis* sería 40.000 microW.s/cm² y para conseguir la muerte de las más resistentes esporas fúngicas se precisarían 600.000 microW.s/cm². La exposición excesiva a la radiación ultravioleta origina quemaduras graves de la piel por lo cual su empleo es delicado. Los niveles máximos permitidos han establecido en 0.5 y 0.1 microW/cm² para exposiciones continuas de 8 y 24 horas respectivamente que equivalen a dosis de 14.400 y 8.649 w.s/cm².

En otros tiempos las lámparas ultravioleta se empleaban con frecuencia en cabinas bacteriológicas y habitaciones estériles donde permanecían en funcionamiento durante los periodos que se consideraban adecuados para reducir a un minuto la población bacteriana. Sin embargo era necesario un estricto control cuando estas lámparas se empleaban para esterilización por que debido a lo limitado de su duración activa solamente emitían luz visible una vez que los rayos ultravioleta de acción bacteriana había reducido considerablemente su actividad. Este método de esterilización se ha reemplazado por la desinfección.

RADIACIONES IONIZANTES

El tipo de radiación ionizante puede ser electromagnético o de partículas. La radiación particular está constituida por rayos catódicos de electrones de alta energía producidos por generadores de alto voltaje (p.ej. aceleradores lineales) como los empleados para el tratamiento del cáncer. las radiaciones electromagnéticas son de longitud de onda corta, tales como los rayos X, radiación gamma y rayos cósmicos. Son altamente letales y actúan ionizando las moléculas a su paso. Su poder de penetraciones muy elevado por lo cual los usuarios de los mismos deberán estar suficientemente protegidos mediante el empleo de material especial adecuado.

La acción letal de las radiaciones, se cree es debida a su acción sobre el DNA nuclear y sobre los componentes vitales de las células. No se aprecia un aumento notorio en la elevación de la temperatura y frecuentemente el procedimiento se le denomina "esterilización en frío".

Ambas formas de radiación ionizante se miden en RDAs (unidad arbitraria correspondiente a la absorción de 100 ergios de energía/gramo de material irradiado) considerándose que 2.5 megaRADs son necesarios para lograr la esterilización bajo condiciones controladas. Las formas vegetativas de bacterias y los virus de mayor tamaño mueren con fracciones de esta dosis de esterilización, siendo los gérmenes Gramnegativos más susceptibles que los Grampositivos. Las esporas bacterianas, los hongos y los virus de 20 - 75 nm de diámetro requieren dosis del orden 1-2 megaRADs y en el caso de virus más pequeños (20 nm de diámetro) son necesarias dosis de hasta 4 megaRADs para asegurar su destrucción.

RADIACIÓN GAMMA

Se emplean dos fuentes de radiación gamma: el cobalto-60 con energía de 1.3 MV ($1\text{MV} = 1 \times 10^6 \text{ eV}$) y el cesio-137 de 0.6MV, siendo los dos producidos por reacciones atómicas. El isótopo cobalto-60 tiene una vida media de más de 5 años y es la fuente empleada para esterilización. El cesio-137 no es adecuado como el cobalto a causa de su menor rendimiento energético. La planta de irradiación consiste en una fuente de radiación gamma de cobalto-60 con actividad del orden de 200.000-300.00 curios (el curio es la unidad de medida de la actividad de una sustancia radiactiva comparada con la de 1 g de radio). Consiste en una serie de varillas de cobalto cada una de las cuales tiene el tamaño de un lápiz y son radiactivas por el tratamiento en un reactor atómico.

Se colocan en un tubo de acero inoxidable sellado herméticamente formando una unidad y se introducen en una cámara de hormigón de paredes de 1.75 m de espesor. Cuando sea necesario penetrar en la cámara de esterilización la unidad se introduce en un tanque de agua desmineralizada o en un foso de hormigón con cubierta del mismo material para que el operador quede protegido durante el manejo.

RADIACIONES POR ELECTRONES DE ALTA ENERGÍA

Esta forma de radiación ionizante se produce mediante dos tipos de aceleradores de electrones: el generador de Van der Graaf y el acelerador lineal con energías pico del orden de 1-5 MV. Tienen la ventaja de poderse conectar y desconectar a diferencia de los hisopos radiactivos que emiten radiaciones ininterrumpidamente necesitando un ciclo de trabajo continuo para obtener una economía elevada. Sin embargo el grado de penetración de los electrones de elevada energía es bajo y solamente pueden ser tratados los artículos de pequeño tamaño.

El tiempo de esterilización que se requiere es solamente de unos segundos y las medidas de seguridad están perfectamente controladas al poder ser dirigido eficazmente el rayo de electrones. La unidad de irradiación funciona en sistema de cinta transportadora, siendo el costo de instalación mucho menor que el de las plantas de irradiación gamma aunque no se emplea de modo general para la esterilización de instrumentos de microbiología y principalmente medicina.

6.4 MÉTODOS QUÍMICOS

Cuando se considera la mejor manera de manejar un problema relacionado con la destrucción de los microorganismos, el calor debe ser siempre el método de elección; sin embargo hay muchas situaciones en las cuales el único modo satisfactorio y conveniente es con el uso de agentes químicos.

Los agentes químicos se emplean principalmente para reducir una población microbiana dada.

Los métodos Químicos para la eliminación de microorganismos se discutieron en el capítulo anterior, pero es importante hacer mención de estos, para conocer su clasificación y saber distinguir un método de esterilización de un método de sanitización y/o desinfección:

- Antisépticos halogenados
- Agentes reductores
- Ácidos inorgánicos
- Colorantes antisépticos
- Aceites esenciales
- Detergentes catiónicos
- Gases (Oxido de etileno, Formaldehído, etc.).
- Antisépticos oxidantes
- Metales pesados
- Alcoholes
- Fenoles
- Detergentes aniónicos
- Nitrofuranos.

Antisépticos halogenados. Yodo y Derivados.

Estos se extraen de las algas marinas. Son solubles en alcohol, poco en agua, utilizando yoduro de potasio, éste hace las veces de intermediario, aumentando su solubilidad en agua y manteniendo el índice de yodo, Es un potente fungicida y germicida, pero, en presencia de materia orgánica, se convierte en yoduro inactivo y pierde poder, pero es un excelente antiséptico de superficies. Un ejemplo de este es el Yodoformo.

Cloro. Es un elemento gaseoso obtenido por electrólisis de cloruro de sodio, de potente acción germicida, aunque no se emplea como tal, sino en forma de compuestos: hipoclorito y cloraminas. El cloro y sus derivados estudiados constituyen potentes germicidas, son bactericidas, viricidas y amebicidas inespecíficos, pero poseen el inconveniente de combinarse con la materia orgánica, disminuyendo su eficacia.

Se transforman en ácido hipocloroso y ejerce de esta forma una acción germicida doble: a) por combinación con las proteínas bacterianas y b) por destrucción de las bacterias oxidándolas, ya que el ácido hipocloroso libera oxígeno con facilidad, a esta acción oxidante se debe el poder desodorizante de estas sustancias. Ejemplo: Hipoclorito de calcio (o cloruro de cal).

AGENTES OXIDANTES

Agua oxigenada (peróxido de Hidrógeno). En presencia de la enzima catalasa, presente en todos los tejidos, se descompone liberando oxígeno naciente. Así esta solución puede generar 10 veces su volumen de oxígeno y produce efervescencia. Es un germicida mientras libera oxígeno, de manera que aplicado a los tejidos sus efectos son muy breves, la materia orgánica lo inactiva rápidamente; concluyendo que no es muy potente; pero su acción resulta más efectiva sobre los anaerobios y tiene acción oxidante.

Agentes reductores. El formaldehído o metanol es un gas de origen sintético, que se utiliza en solución al 40 % y al que se lo denomina corrientemente como formol. Tiene la propiedad de polimerizarse (esto es, la unión de varias moléculas que dan origen a un sólido titulado: paraformaldehído o formalina). La formación de este gas (formaldehído), se origina por calentamiento. Es un potente germicida que combate toda clase de microorganismos (en solución 0.5 % mata todas las formas vegetativas y esporuladas en 2 horas). Cuanto mayor es la concentración, aumenta la efectividad y rapidez, pierde poca actividad en presencia de materia orgánica. Su acción germicida no depende de su poder reductor, sino de la propiedad que posee de combinarse con los grupos aminos libres de las proteínas.

Metales pesados. Mercuriales. Las sales de mercurio, al igual que otros metales pesados (plata, cobre y zinc), precipitan las proteínas formando proteínatos insolubles; por eso son antisépticos y sus efectos se deben a los iones metálicos libres existentes en las soluciones. Existe un gran variedad de compuestos de mercurio:

- | | |
|-----------------------------------|--------------------------|
| *Sales inorgánicas solubles | * Cloruro de mercurio |
| *Cianuro de mercurio | * Oxicianuro de mercurio |
| *Compuestos orgánicos insolubles | * Oxido mercúrico |
| * Cloruro mercurioso | * Mercurio amoniacal |
| *Compuestos mercuriales orgánicos | * Merthiolate |
| * Merphenyl | * Nitromersol |
| | * Mercurocromo |

Los compuestos inorgánicos de mercurio no son bactericidas intensos, sino más bien bacteriostáticos. La acción antiséptica lenta de los compuestos mercuriales se debe a que actúan en dos tiempos, primero los iones mercúricos se absorben a la superficie bacteriana y luego penetran y matan al germen. El más activo, por ser el más ionizable (porque libera con mayor facilidad los iones mercúricos), es el cloruro mercúrico. Los compuestos mercuriales orgánicos casi no son ionizables, sin embargo constituyen antisépticos más activos que los inorgánicos, ya que tienen una potencia de 5 a 10 veces mayor que el cloruro de mercurio, y la presencia de proteínas los afecta poco; en cambio, como los otros se combinan con ellas, pierden acción. De todas maneras, no constituyen bactericidas muy potentes, y sólo bacteriostáticos activos, razón por lo que no son útiles para desinfectar instrumentos.

Nitrato de plata. Sustancia cáustica capaz de destruir tejidos que actúan químicamente sobre el protoplasma por la coagulación de las proteínas. Sus soluciones diluidas intervienen como astringentes a causa de su acción precipitante sobre las proteínas. Los preparados de plata como; el Protargol, el Argirol y el Colargol se ionizan y tienen acción bactericida. Esta propiedad de la plata y de otros metales pesados al actuar en diluciones muy grandes se denomina acción oligodinámica.

El ion plata actúa precipitando las proteínas del protoplasma bacteriano, y como consecuencia, su acción es antiséptica. Las sales de plata actúan en dos tiempos: a) con efectos rápidos por la acción precipitante proteica de los iones plata y b) acción lenta y sostenida, por la lenta solución y ionización de las proteínas de plata formado.

Ácidos Inorgánicos. Las bacterias pueden ser dañadas tanto por un pH bajo (ácido) como por un pH alto (alcalino), y la mayoría sucumbe a un pH 3 (ácido) o un pH 11 (alcalino). El ácido bórico es mineral muy débil y de relativa acción antiséptica. No es germicida, vale mencionar, que sólo se comporta como bacteriostático y las soluciones al 0.5 y 1 % tienen un efecto sobre la mayoría de los gérmenes incluidos los hongos.

Alcoholes. Alcohol etílico; no es muy germicida, ya que las bacterias desecadas conservan su actividad después de permanecer 24 horas en alcohol absoluto, es decir, posiblemente, porque carecen de penetrabilidad en ausencia de agua (las deshidrata pero no las mata). El alcohol lesiona las células y endurece los tejidos por la acción deshidratante y precipitante de las proteínas. Para que el alcohol sea activo como agente mortal, es necesario la presencia del agua, y un contenido final de alcohol de 60 ó 70 % en agua, que constituye la mezcla óptima.

Fenoles. El fenol es el más antiguo de los antisépticos empleados y se extrae por destilación del alquitrán de hulla; por síntesis, se extraen los cresoles, que son sustancias afines del fenol. En solución concentrada tiene acción cáustica, si la concentración es menor, se combina con las proteínas precipitándolas y si se diluye aún más, se consigue la desnaturalización, sin precipitarlas. La combinación fenol-proteína no es muy estable, de manera que el fenol se libera y difunde, razón por la que tiene poder penetrante en los tejidos y su potencia antiséptica es poco afectada por la presencia de materia orgánica. Al 2% es bactericida para muchos gérmenes comunes. Como fungicida su acción también resulta efectiva.

Cresoles. Son tres veces más potentes que el fenol. En la práctica se emplea una mezcla de los tres isómeros: orto-, meta- y para, a la que se incorpora una solución jabonosa conocida como acaroína.

Otros tipos de fenoles son:

Resorcinol. Es llamado también resorcina y es tres veces menos antiséptico que el fenol.

Hexilresorcinol. Es 45 veces más potente que el fenol.

Timol. También pertenece a la familia de los fenoles, pero su actividad se ve muy reducida en presencia de materia orgánica.

Cloroxilenol. Tomando como patrón al fenol, el cloroxilenol es 70 veces más potente. Se expende en forma de solución acuosa al 5%, siendo solubilizada la droga con alcohol y jabón.

Hexaclorofeno. Es 25 veces más potente que el fenol se expende en forma de una emulsión al 3% junto con detergente, vaselina y cresol. el Hexaclorofenol, usado de manera indiscriminada en talcos, jabones etc., con fines antisépticos o administrados en dosis inadecuadas causa intoxicación, puesto que se absorbe por vía cutánea.

Nitrofenoles. El ácido pícrico o trinitrofenol es 6 veces más potente que el fenol, pero muy tóxico.

Colorantes antisépticos. Los más comunes son los siguientes.

Azul de metileno: antiséptico débil; se usa al 1%.

Los colorantes de anilina o de trifenilmetano (verde brillante, violeta cristal, violeta de genciana o verde de malaquita), son moderadamente bactericidas, pero no tienen efecto sobre las esporas bacterianas. Son más activos contra los microorganismos grampositivos que contra los gramnegativos. El efecto letal de los colorantes básicos sobre las bacterias se cree que sea por reacción con los grupos ácidos de la célula y probablemente a su actividad tintórea. Aquí el más común es el violeta de genciana y se emplea en solución acuosa o alcohólica al 1 ó 2%.

Aceites esenciales y derivados. Mentol. Alcohol terpénico obtenido de los aceites esenciales de la Menta piperita, que también se separa por síntesis.

Su acción antiséptica es bastante intensa, es 10 veces más potente que el fenol, se usa al 1%.

Detergentes. Se llama detergente a las sustancias que tienen la propiedad de limpiar las superficies sucias. Esta acción depende en forma exclusiva de su actividad exterior, son agentes superficiales activos o tesoactivos.

Estos elementos poseen en su molécula dos grupos:

- 1) Hidrofílico (polar), con solubilidad y afinidad con el agua.
- 2) Lipofílico (no polar), con solubilidad y afinidad con las grasas y aceites.

Los detergentes pueden ser divididos de la siguiente manera:

Aniónicos. En donde el grupo lipofílico lleva la carga negativa (jabones).

Jabones: se clasifican en dos tipos; de sodio, más duros y menos solubles, y de potasio, blandos. Poseen acción germicida; en especial contribuyen a la desinfección de la piel mediante el lavado y el arrastre mecánico de los gérmenes.

Catiónicos. El grupo lipofílico lleva la carga positiva (compuestos de amonio cuaternarios). Cloruro de benzalconio, Cloruro de benzetamonio, Cloruro de cetilpiridinio, Cetrimida, Cloruro de lauraminio. Son potentes germicidas; actúan sobre bacterias grampositivas, gramnegativas y virus. Sus propiedades humectantes y detergentes refuerzan sus efectos antisépticos, cuando se humedecen las superficies a las que penetran y limpian arrastrando las bacterias.

Nitrofuranos: Nitrofurazona. de los nitrofuranos, la nitrofurazona, es el de mayor acción antiséptica local. Se usa al 0.2% en solventes inertes como los polietilenglicoles. In vitro es de acción bacteriostática, según su concentración. No se conoce muy bien su mecanismo de acción y aunque disminuye su actividad en presencia de materia orgánica, esto no resulta tan importante como para que pierda su efectividad.

GASES

Oxido de Etileno. Es un líquido altamente reactivo, con un punto de ebullición de 10.7 °C y a temperaturas y presiones normales es un gas muy penetrante con dulce olor etéreo. Es muy flamable y cuando su concentración es mayor que el 3% es altamente explosivo. La exposición a altas concentraciones puede causar irritaciones de las mucosas, los ojos y la nariz, semejante a la causada por los vapores de amoníaco, seguida por náuseas y vómito que desaparecen cuando cesa la exposición. La concentración máxima segura en aire recomendada es de 10 partes por millón en volumen y es aconsejable practicar esta esterilización en cuartos bien ventilados. Se usa en estado gaseoso para la esterilización de materiales sensibles al calor.

Se ha empleado durante muchos años para preservar alimentos y como insecticida y, desde algún tiempo, para propósitos médicos. El gas puede usarse a relativamente bajas temperaturas y no corroe ni daña una amplia variedad de materiales y, aunque mucho más lento y menos confiable que el calor húmedo o seco, es un medio de esterilizar equipos que se dañarían tanto como el calor como por la radiación ionizante. Es por tales razones que este proceso de esterilización ha de hacerse bajo una supervisión cuidadosa. La acción del gas sobre los microorganismos se atribuye a su poder de alquilar los grupos sulfhidrilo amino, carboxilo e hidroxilo de la molécula proteica. Es efectivo contra todo tipo de microorganismos, incluyendo a los virus y las esporas bacterianas, éstas son sólo 10 veces más resistentes que las formas vegetativas.

Los factores que influyen sobre la acción esterilizante del óxido de etileno son:

- a) tiempo,
- b) temperatura,
- c) humedad,
- d) presión del gas,
- e) la naturaleza del material
- f) el grado de contaminación

La gama de temperaturas que se utilizan pueden ir desde la temperatura ambiente a los 56°C, el tiempo efectivo de esterilización se reduce a medida que aumenta la temperatura. Las concentraciones biocidas del gas están entre 400 y 1,000 mg/litro a la temperatura del cuarto en una atmósfera con 30 % de humedad relativa.

Para una esterilización satisfactoria es deseable una humedad relativa de 30 %, en otros continentes, por ejemplo, Europa varía entre 30 y 95 %. Dentro de los edificios el nivel promedio es del 10 % más bajo.

La presencia de proteínas reduce la eficacia esterilizante del gas y cualquier aparato que vaya a ser esterilizado deberá lavarse cuidadosamente de antemano para asegurarse de que toda proteína haya sido eliminada.

El gas del óxido de etileno se difunde a través de muchos tipos de materiales porosos y con facilidad penetra algunos plásticos.

Cuando se esteriliza con óxido de etileno puro, se requiere de un gabinete especial, que debe tener una cámara hermética, que pueda ser calentada y evacuada, debe contar con facilidades para el llenado con el gas y medios con los cuales el gas pueda ser aireado al terminar el ciclo de esterilización.

Existe un equipo que provee un ciclo automático que el material sea esterilizado a temperaturas que van de la ambiente a los 60 °C por períodos hasta de tres horas o más si es necesario. El gas es provisto. En botecitos a presión, desechables que se reponen después de cada esterilización. Con este equipo se logra una concentración de gas de 1,200 a 1,400 mg/litro. Lo cual permite que la carga absorba una cantidad apreciable del gas, y se mantienen niveles de 900 mg/litro. Los ciclos habituales para este tipo de esterilización son de una hora de duración a 55°C; 6 horas a 30°C, o 18 horas a 30°C para materiales que tomen más tiempo en cuanto a su penetración.

La prueba microbiológica para la esterilización con óxido de etileno se basa en que ésta debe matar las esporas de *B. globigii* a una concentración de 10^6 de esporas.

Se usan tiras de papel de aluminio sobre las cuales se coloca la tira con esporas. Se tapa con algodón cada extremo del tubo y luego se sellan los tubos con una membrana de polietileno (calibre 250 politeno). Después de la esterilización la tira control se siembra en un medio adecuado de recuperación y se incuba durante 5 días a 37°C para comprobar la esterilidad.

Debido al tiempo que se requiere para obtener los resultados de una prueba bacteriológica, es conveniente también usar un indicador químico el cual dará un inmediato cambio de color; después de un ciclo de esterilización satisfactorio.

Un indicador excelente es la "almohadilla de Royce"; consiste en un sobre de polietileno que contiene una solución saturada, libre de ácido, de cloruro de magnesio. Se agrega como indicador, azul de bromofenol y cambia de color del amarillo (ácido) al púrpura (alcalino) al formarse etilenclorhidrina a partir del óxido de etileno.

Esto ocurrirá cuando la almohadilla sea expuesta al gas durante 16 ó 18 horas a la temperatura ambiente. Y la reacción también se realizará después de 2 horas de exposición a 30 °C para asegurar la esterilización y, para este ciclo, la prueba microbiológica es el único indicador satisfactorio.

FORMALDEHÍDO

La esterilización gaseosa con formaldehído se reserva para aquellos artículos que no se deben mojar con soluciones o que no se puedan sujetar a altas temperaturas, por ejemplo, instrumentos susceptibles al calor. También se emplea para fumigar salas de enfermos, cuartos y áreas de laboratorio.

El formaldehído (CH_2O) como compuesto químico tiene gran tendencia a polimerizarse. Tiene gran afinidad por el agua y las concentraciones del gas libre generalmente no exceden a 1.75 ó 2 mg/litro. A concentraciones mayores se condensa y se polimeriza para formar el paraformaldehído. El formaldehído está disponible comercialmente como formalina que es una solución de 38 ó 40 % peso/volumen de formaldehído en agua que contiene 10 % de metanol, el cual se agrega para evitar la polimerización. En esta forma su punto de ebullición es de 90°C. La acción esterilizante del formaldehído se considera debida a su propiedad de reaccionar con los grupos amino de las moléculas proteicas y produce un efecto altamente letal sobre todos los microorganismos, tanto en su estado vegetativo como es los esporulados.

Concentraciones en aire en el orden de 1 a 2 mg/litro a 20°C destruirá a la mayoría de las formas vegetativas en 6 horas, siempre y cuando la humedad relativa sea mantenida a una concentración de 80 a 90 %. Si la humedad cae a 60% , el efecto mortífero se reduce considerablemente. Para asegurarse de que todas las esporas bacterianas y los bacilos acidoresistentes mueran, se requiere un lapso de 24 horas.

Se debe tener cuidado cuando se usa formaldehído, ya que el gas, si es inhalado, es irritante y tóxico. Si las superficies de los equipos emanan continuamente un vapor irritante, es debido a que el formaldehído se ha polimerizado a paraformaldehído y se puede neutralizar exponiéndolos a vapores de amoniaco (con el cuidado respectivo).

CITAS TEXTUALES

- 4.-BIDOU, Dora Beatriz. Juan Carlos Grupillo, Fundamentos y Técnicas de Esterilización, Control de Materiales y Esterilización, Editorial Médica Panamericana. S.A., México, 1977

- 6.-BREACH, M.R. Westminster Londres, Esterilización Métodos de Control, México, 1985 Edit. El Manual Moderno, S.A., pág. 9 - 94

- 11.-DAVIS, Bernard D. W.D. Renato Dulbecco M.D. and Herman N. Eisen, Tratado de Microbiología Barcelona España 1978, 2ª Edic. Salvat Editores, S.A., pág. 1475 - 1489

- 13.-DICKINSON, Becton C. Medios de Cultivo, Materiales e Instrumentos para Laboratorio de Microbiología, Baltimore Bilological Laboratory Inc., 1995, pág. 262

- 30.-MUÑOZ, Mercado Martha Patricia, Tesis: Diferentes Métodos para el Cálculo del Tiempo de Esterilización por Calor para Alimentos Procesados UNAM, México, 1990

- 35.- SAVIN Consuelo Ma. de la Luz., Judith Márquez y Luis Bojorques, Biología Interacción de Experimentos e Ideas, Consejo Nacional para la Enseñanza de la Biología, A.C., Editorial Limusa México, 1976 pág. 68 - 76, 157 - 159, 179 - 182

VII.- MEDIOS DE CULTIVO

7.1 DEFINICIÓN

En la actualidad se han estudiado mucho acerca de los requerimientos nutricionales de los microorganismos y, con pocas excepciones se pueden obtener por medio de cultivos artificiales, fuera de su hábitat normal, la mayoría de estos. Por tal razón es muy importante destacar la preparación y selección de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de microorganismo, ya sea para su uso industrial y/o estudio.

La definición de los medios de cultivo nos dice que son mezclas de sustancias orgánicas y/o inorgánicas que han sido diseñadas para permitir el crecimiento de los microorganismos, y los requerimientos nutricionales de estos reflejan su capacidad biosintética donde las células pueden obtener sus nutrientes directamente del medio o sintetizarlos a partir de otros materiales. Además de concentraciones adecuadas, así como la sal, agua, pH, consistencia, etc., para la obtención y aislamiento de microorganismos bajo condiciones ambientales adecuadas.

7.2 CLASIFICACIÓN

Con la definición del medio de cultivo ahora podemos clasificarlos, pues para el crecimiento de un microorganismo dado se han de conocer los nutrientes indispensables y todas aquellas características que deben reunir éstos para lograr el aislamiento con los mejores resultados. Tal vez en algunos estudios sea necesario utilizar medios químicamente definidos, que se llaman Sintéticos en los que todos los nutrientes esenciales se proporcionan químicamente puros. Estos medios sintéticos con frecuencia son difícilmente producidos por bacterias heterótrofas. Por lo tanto, para estos organismos se emplean medios complejos, en los que no son definidos con exactitud todos los ingredientes.

Los medios complejos son por lo general mezclas de productos orgánicos de plantas, animales, o levaduras sólo con las sales adecuadas, y comúnmente los nutrientes necesarios para el desarrollo de un rango amplio de bacterias. Con frecuencia se emplean productos como extractos de malta, musculosa u otro tejido animal o levadura para hornear. También se utilizan ácidos o enzimas de carne digerida, caseína o proteína de soya. Estos productos contienen la mayoría de los nutrientes, tanto de origen orgánico como inorgánico, que son necesarios aun para los microorganismos más delicados.

En la actualidad los medios de cultivo los producen compañías comerciales, las cuales los surten a los laboratorios como productos deshidratados y éstos al utilizarlos les dan el tratamiento necesario para cada uno.

Es muy importante saber que son los medios de cultivo, pero es más importante saber y hacer una breve pausa para examinar que es un microorganismo y como se clasifican, para así clasificar los medios de cultivo y tener una visión más amplia.

7.2.1 MICROORGANISMOS

Existe en todo lugar un gran número de pequeños seres vivos que no se perciben a simple vista ni se advierte su presencia, para visualizarlos es necesario utilizar un microscopio pues por esta causa se denominan microorganismos del griego MICROS-pequeño- y BIOS-vida- de ahí su definición: forma de vida de tamaño microscópico cuya magnitud se mide con unidades especiales, como la micra o micrón 1/1.000 mm.

CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Los microorganismos se pueden dividir en siete grupos principales: Algas, Protozoarios, Bacterias, Hongos, Rickettsias y virus.

Algas azul verdes. Las algas más comunes son aquellas pequeñísimas plantas que cubren, formando un manto, las superficies de las aguas estancadas en los terrenos bajos. Otra forma de algas son las marinas. Las algas azul verdes son de tamaño microscópico y, por su formato, parecidas a las bacterias, pero más grandes que éstas y poseen un pigmento verde-clorofila junto con otros pigmentos azules y rojos, por cuyo intermedio se realiza el proceso de la fotosíntesis.

Protozoarios. Son microorganismos microscópicos, minúsculas formas de vida, de tipo animal; por ejemplo: género *Plasmodium*, que en el hombre producen paludismo.

Bacterias-protozoarios. Tienen como representantes a las *Spirochaetas*, son microorganismos delgados, móviles, flexibles, en forma de espiral, con una fibrilla central que tiene movimientos ondulatorios y flexores para su locomoción, por ejemplo: *Treponema pallidum*, que origina sífilis.

Bacterias Verdaderas. Pueden ser consideradas el grupo más simple de los microbios de tipo vegetal y el que comprende las bacterias más numerosas y mejor conocidas, dentro del cual es accesible reconocer como principales a los : -Cocos (esféricos) ; por ejemplo, *Streptococcus* .

-*Bacilos* (forma de bastoncillos); por ejemplo, *Bacillus*, *Salmonella* y *Clostridium*.

-*Espirilos* (espirales pequeñas y rígidas) ; por ejemplo, *Vibrio* y *Spirillum*.

Hongos verdaderos. Son microbios que comprenden a los mohos comunes, filamentosos y ramificados; levaduras y formas afines: por ejemplo, género *Aspergillus* (mohos comunes) y género *Saccharomyces cerevisiae* (levaduras comunes).

Bacterias tipo hongos. Son microorganismos con ramificaciones y filamentos que se parecen a los hongos verdaderos, aunque también poseen formas del tipo de las bacterias ordinarias; por ejemplo, género *Mycobacterium*: bacterias acidorresistentes que comprenden los bacilos de la tuberculosis y de la lepra.

Rickettsias. Son microbios especiales, más pequeños que la mayoría de las bacterias, pero, sin embargo, todavía visibles a la luz del microscopio ordinario. Crecen en el interior de las células, en algunos insectos y artrópodos, en huéspedes humanos y en animales; no cultivables en los medios corrientes de laboratorio.

Virus. Constituyen los únicos parásitos intracelulares ultramicroscópicos que constan de un centro de ácido nucleico (ADN ó ARN) encerrado en una cubierta de proteína. En realidad, son inocuos, excepto cuando viven de manera parasitaria, en determinadas células vegetales, animales o microbianas vivas, donde utilizan el aparato metabólico de su célula huésped para su propio desarrollo y multiplicación. No son cultivables en medios corrientes de laboratorio; por ejemplo, los de la viruela, varicela, influenza sarampión, etc.

Con la pequeña visión a los tipos de microorganismos citados en el párrafo anterior se observa que no es posible cultivar cada tipo de microbio en un mismo medio y hasta incluso en algunos casos ni siquiera son cultivables, es por esto que deben existir diferentes tipos de medios y se clasifican en :

- a) Sólidos
- b) Líquidos
- c) Semisólidos

Que a su vez se subdividen en:

- 1) Pre-enriquecidos
- 2) Enriquecidos
- 3) Simples no sintéticos
- 4) Selectivos y/o diferenciales
- 5) Sintéticos y no sintéticos

7.2.2 MEDIOS SÓLIDOS

La capacidad para seleccionar macrocolonias que sean puras (es decir, que consten de una sola clase de bacterias) constituye la base de la práctica de la microbiología y bacteriología moderna. Se comenzó con el empleo de superficies cortadas de papas y zanahorias (1872) y de ahí al empleo de la gelatina (1880) y el empleo del agar (1881) que desde entonces es empleado y no ha sido sustituido por otro agente solidificante, aunque el suero coagulado y el huevo son usados algunas veces.

Estos medios constan esencialmente de agar, gelatina o albúmina. El agar es la sustancia coloide hidrófila ya sea extraída de las algas marinas (especies *Gelidium*). Es un polisacarido complejo lo cual explica la razón por la cual el agar proviene de diferentes fuentes se comportan diferentes. Se disuelve en agua cerca y se calienta a 100°C y se "gelifica" o "solidifica" al enfriarse a 32-40 °C y no vuelve a licuarse hasta que se hierve de nuevo. El agar se añade comunmente en una concentración del 2 al 3%. Generalmente tiene un pH ácido.

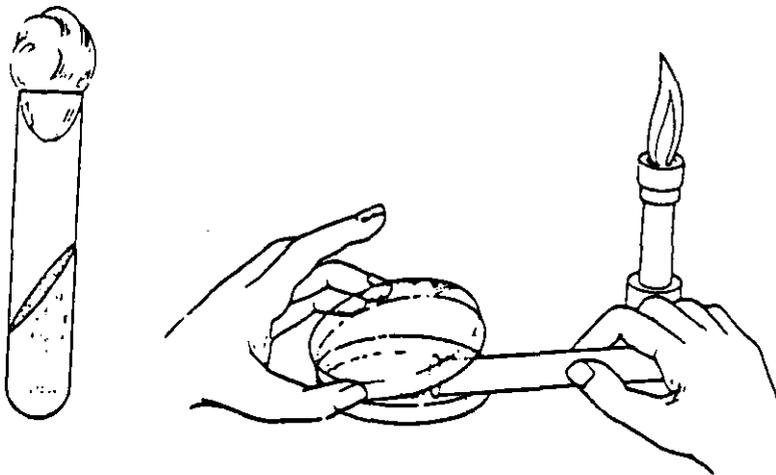
La gelatina, por lo general, se añade a los medios de cultivo en una proporción del 10 al 15%, con lo cual el medio se solidifica solamente a temperaturas inferiores a los 25°C (punto de fusión de la gelatina); por encima de esta temperatura los medios se vuelven líquidos de nuevo, lo cual es una ventaja en el aislamiento de algunas bacterias. La gelatina es un medio de diagnóstico porque algunas bacterias la licúan y otras no.

La albúmina, a diferencia de la gelatina y el agar que se funden con el calentamiento, es coagulada por el calor, formando un medio con una cantidad conveniente de alimento y un grado adecuado de firmeza para algunas bacterias, como por ejemplo, el suero sanguíneo de Löffler para *Corynebacterium diphthriae*.

Las limitaciones del medio sólido incluyen la difusión restringida de nutrientes a las células encima de la colonia; el rápido agotamiento de los nutrientes en la zona inmediata a la macrocolonia, y la acumulación de productos de desecho con las consecuencias de inhibición tóxica.

Las principales formas de utilización de este medio son en cajas Petri y en tubo inclinado con tapón de rosca o de algodón.

FIGURA 13



7.2.3 MEDIOS SEMISÓLIDOS

Se prepara añadiendo el agar en una proporción de 1 a 1.5 % o con una mezcla de agar y gelatina. Son especialmente útiles para conservar vivas las cepas de los cultivos por largos periodos.

El ejemplo más común de medio semisólido probablemente sea el caldo de tioglicolato (medio Brewer), pero se dice que combina las ventajas y desventajas de los medios sólidos y líquidos. En particular, debido a la omisión del indicador de azul de metileno, constituye un medio muy valioso para el crecimiento de cantidades pequeñas de organismos, especialmente aquellos dañados por anticuerpos, los cuales son ayudados por el efecto de dilución del inóculo. Se mantiene otra ventaja clásica del medio semisólido, los organismos crecen con patrón más "típico" que sobre un medio sólido y a menudo es útil el pasar un organismo a través de un medio semisólido si se tiene duda de su forma y enseguida podemos preguntar si es un coco o un bacilo que constituye un enigma para su rápido diagnóstico.

Las dificultades en el manejo, en especial en lo que toca a la formación de aerobios, derramamientos y la necesidad de pipetas Pasteur para subcultivos constituye una barrera para el uso de un medio semisólido. Sin embargo, no deja de hacerse hincapié en forma excesiva que el muestreo del medio semisólido mediante una asa no es una técnica válida y que es esencial el uso de alguna forma de pipeta.

7.2.4 MEDIOS LÍQUIDOS

Se preparan sin sustancias como el agar o gelatina y por lo tanto no se solidifican o gelifican. Se llaman comúnmente Caldo y constituye el ingrediente básico de muchos medios de cultivo, y los hay de tres tipos:

1.- Caldo de infusión, el cual es una preparación de agua extraída de la carne desgrasada con adición de peptona. Este caldo da buenos resultados pero es costoso.

2.- Caldo de extracto de carne, es fácil de preparar, pero se afirma que es menos nutritivo que un caldo de infusión o que el caldo digerido.

3.- El caldo digerido se prepara por la digestión enzimática de carne empleando tripsina o papaína. El crecimiento rápido y exuberante en este medio va acompañado de una rápida declinación y muerte, razón por la cual los otros tipos de caldo son empleados para el mantenimiento de cultivos.

El caldo puede hacerse sin extracción de carne para organismos menos exigentes (0.5% de peptona en agua) y puede omitirse la sal, si la isotonicidad no constituye problema alguno. También existen caldos que pueden substituir la carne como fuente de proteínas; empleando extractos de verdura, hidrolizados de caseína o semilla de soya. Es importante tener presente que los caldos varían en su capacidad de promover y fortalecer el crecimiento de los organismos, y aunque parezcan iguales no es base alguna para decidir que cualquier caldo pueda utilizarse y que este será suficiente. Como en todos los medios de cultivo el resultado será proporcional a la cualidad de los reactivos y del cuidado de la preparación.

La carne desgrasada fresca dará mejores resultados que la carne de mala calidad. No se recomienda la carne de caballo debido a la concentración muy elevada de carbohidratos que posee, pues el porcentaje de carbohidratos disponibles influirá no sólo en la producción de toxinas, sino también en la supervivencia de los organismos, debido al aumento cada vez mayor de un pH ácido producido como resultado de la actividad metabólica.

Quizá el efecto más obvio de la concentración de glucosa radique en la influencia sobre el aspecto o ausencia de hemólisis. Una concentración aproximada a 1% o más, tiende a inhibir la reproducción de grandes zonas de hemólisis completa. La concentración de hasta 0.2% parecen satisfactorias.

7.2.5 MEDIOS SINTÉTICOS

Un medio sintético es aquel en el que se conoce la composición química exacta de los ingredientes. Por ejemplo: la solución de Ringer y la solución de Locke.

7.2.6 MEDIOS NO SINTÉTICOS

Los medios no sintéticos son aquellos de los cuales no se conoce de una manera definida su composición precisa de alguna o de todas las sustancias nutritivas. Por ejemplo: caldo de extracto de carne, agar vitaminado, entre otros.

7.2.7 MEDIOS ENRIQUECIDOS

Un medio enriquecido es el término al medio sólido fortalecido mediante la adición de sangre, suero o algún otro nutriente específico. Uno de los elementos más comunes para enriquecer un medio de cultivo es por medio de sangre de caballo, que vertida en cajas Petri al igual que la gelosa sangre, donde la concentración varia de 5% si se usan placas de una sola capa hasta 7-8% cuando se preparan placas de varias capas. Esto implica el vaciamiento de una capa delgada de gelosa nutriente sobre el sedimento de una caja Petri, el cual se deja que se convierta en gel, vaciándole otra capa de mezcla de gelosa sangre fundida. Las burbujas deben eliminarse rápidamente pasando la fama de un mechero Bunsen sobre la superficie del medio mientras esta todavía líquido aunque las placas preparadas por un proceso semiautomático no debería tener burbujas.

Como este medio existen varios medios enriquecidos más, por ejemplo: Gelosa chocolate, medio de carne cocida Robertson, etc.

7.2.8 MEDIOS SELECTIVOS

Son medios sólidos que contienen sustancias que inhiben el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos con excepción de aquellos para los que se han ideado, para estudiar y caracterizar un microorganismo en particular, donde primero se tiene que separar y desarrollar libre de otros microorganismos, para un análisis específico como el medio de MacConkey que es para todas las bacterias patógenas enterales habituales, el medio Telurito para el bacilo de la difteria y el agar citrato-desoxicolato para los grupos *Salmonella* y *Shigella*.

7.2.9 MEDIOS DIFERENCIALES

Son los que contienen sustancias o indicadores que permiten la diferenciación de un microorganismo de otro. Se incluyen muy diversos medios en los cuales los microorganismos se desarrollan de una manera característica que facilita su aislamiento. Ejemplos de estos medios son: el suero sanguíneo de Löffler, el agar de Endo, el medio de Wilson-Blair, el agar verde brillante, el agar sangre, el medio triple azucarado de Krumwiede. En ocasiones se les conoce como medios indicadores.

7.3 PREPARACIÓN Y USO

Esta operación representa uno de los más importantes aspectos de la microbiología ya que un fallo para asegurar la exacta preparación y el control podrá impedir o inhibir la obtención de microorganismos. El exceso de calentamiento destruye los factores esenciales del medio, desnaturaliza proteínas y los azúcares, formar precipitados, destruye el poder gelificante del agar y alterar el pH. La esterilización debe realizarse a la más baja temperatura requerida y el tiempo más corto posible, los utensilios empleados así como el material de vidrio deben de estar limpios y el ajuste del pH efectuado con exactitud. Entre otros podemos señalar lo siguiente:

- 1.- Defecto en la medición ó peso de los ingredientes.

- 2.- Falta de frescura del medio, lo que genera pérdida de humedad y concentración de los componentes, ó bien degradaciones, oxidaciones ó reacciones entre ellos.

- 3.- La presencia de residuos de detergentes en el material de vidrio.

- 4.- Efecto germicida del agua utilizada en su preparación por presencia de trazas de ciertas sustancias como impurezas.

- 5.- Defecto en el ajuste del pH desde antes de su esterilización ó por efecto del calentamiento.

- 6.- Sustancias bacteriostáticas dentro de la formulación, con actividad no controlada (más baja ó más alta que la requerida) : colorantes, antibióticos , etc.

- 7.- Excesiva humedad en la superficie del medio, que favorece el desarrollo de colonias extendidas ó su confluencia.

8.- Sobrecalentamiento del medio al esterilizar sea por el empleo de temperatura más elevada ó por períodos más prolongados. Perdiendo así el poder de nutricional del medio, su capacidad diferenciadora ó su consistencia.

9.- El esterilizar medios sobrantes pues suelen hidratarse del medio ambiente y así perder sus características deseadas.

De aquí la importancia de una buena preparación pues como lo mencionamos anteriormente el éxito y la válida de un análisis microbiológico depende en su mayoría en el medio de cultivo.

Algunas recomendaciones para su preparación son:

- a) Usar reactivos, ingredientes o productos deshidratados de marcas y proveedores especializados que nos pueden describir tanto su preparación como el fin al cual se van a destinar.
- b) Prepara únicamente, lo volúmenes deseados respetando las indicaciones.
- c) Pesar cuidadosamente el medio y los ingredientes en áreas libres de corrientes de aire y con poca humedad.
- d) Adicionar el agua, agitando vigorosamente y dejar reposar para iniciar la disolución.
- e) Si hace falta, calentar para lograr la disolución de los ingredientes, se recomienda utilizar una parrilla con agitador (teniendo en cuenta que el electrodo debe estar correctamente limpio y que se use exclusivamente para microbiología).
- f) Los recipientes que se utilicen para disolver los medios deben tener una capacidad al menos dos veces mayor a la del volumen del medio que se preparara.
- g) Al ajustar el pH debe ser a 25°C con un potenciometro calibrado.
- h) El agua a utilizar es muy recomendable que sea recién destilada o desionizada que cumpla con las especificaciones necesarias.
- i) El material de vidrio y el de acero inoxidable que se usen deben haberse sometido a lavado y enjuagado exhaustivos.

j) Si el medio requiere de la adición de otros componentes (sangre, suero, vitaminas etc.) estos deben estar estériles.

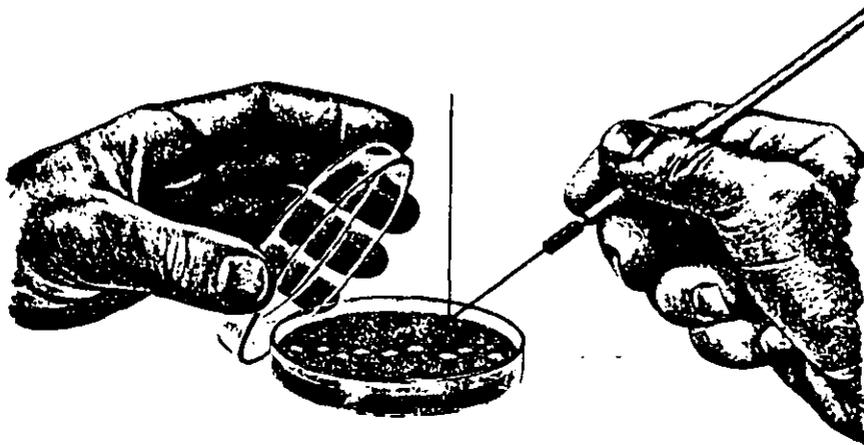
Para su uso se debe mencionar también, su almacenamiento, y los tipos de distribución.

DISTRIBUCIÓN EN PLACAS

Esta distribución se realiza en cajas Petri, que tienen varios diámetros pero las más comunes son de 9 cms, en las cuales se necesitan entre 15 y 17 ml de medio para proporcionar una profundidad adecuada para el desarrollo de organismos y evita la excesiva deshidratación del medio. Por lo general, es mejor el verter el medio al rededor de 55 °C porque a más temperatura el exceso de agua condensada puede originar problemas posteriores. Esta temperatura debe tolerarse al tacto por algún tiempo.

No deben existir burbujas en la capa del medio, de ser así, con el mechero Fisher al pasarlo ligeramente por encima del medio recién vertido en la caja se eliminan, aunque se evitan las burbujas con el manejo delicado del medio. El llenado de las placas debe hacerse en una área estéril y/o aséptica a la cual durante el proceso es recomendado no tener corrientes de aire, como en una campana de flujo laminar, es decir, que nadie tenga acceso a tal área más que el analista, si no se cuenta con una habitación para este fin se debe contar con una región libre de bacterias la cual se puede conseguir con un mechero Bunsen con flama intensa.

FIGURA 14



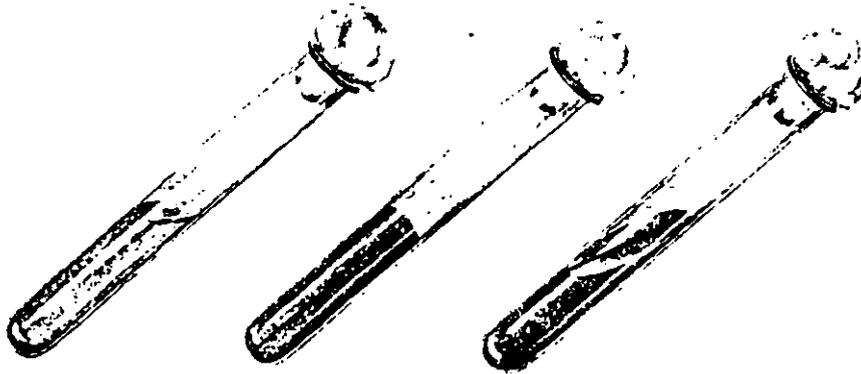
Actualmente pueden comprarse cajas Petri de plástico, las cuales tienen muchas ventajas, tales como la facilidad de manipulación, menor peso, facilidad de desecho, menor costo además de que están estériles. Para algunas pruebas no pueden ser empleadas, por ejemplo; para la tipificación con colicina, debido a que es afectada por el cloroformo, la presión del moldeado y la escasa flexibilidad de la caja pueden hacer que la caja sea succionada hacia abajo sobre el borde de la base, durante la etapa de evacuación al instalar un frasco aerobio.

DISTRIBUCIÓN EN TUBOS Y VIALES

Muchas pruebas que han sido ideadas para la diferenciación de gérmenes requieren medios sólidos, no siempre es necesario efectuar la inoculación sobre la totalidad de una placa en caja por lo que es suficiente con tubos que contengan el medio en superficie inclinada. Son simplemente tubos o frascos que contienen una pequeña cantidad de medio y que sea ha dejado solidificar manteniéndoles inclinado y que deben contar con un tapón ya sea de algodón con capuchón de papel (el algodón que se utilice no debe soltar fibras además,

es imprescindible que no se carbonice cuando se esterilice pues puede producir ácidos grasos con efecto bactericida sobre los microorganismos que crezcan en el medio), plástico con rosca, aluminio o acero inoxidable. La distribución en tubos debe hacerse en las mismas condiciones que las placas.

FIGURA 15



ALMACENAMIENTO

Los medio de cultivo preparados deber ser identificados ya sea utilizando un código de colores que en el caso de los tubos puede ser con tapones de colores o simplemente bien identificados con etiquetas o tinetas indelebles al igual que las cajas, deben almacenares en una atmósfera fría por tanto pueden conservares perfectamente en un refrigerador (entre 2 - 8 ° C). En cuanto a la luz, no debe ser intensa pues puede producir sustancias inhibidoras, especialmente a los medios que contienen indicadores de sangre o colorantes.

En cuanto a los medios sin preparar o deshidratados, estos deben estar bien identificados en sus frascos contenedores de origen, es decir del proveedor, deben estar bien tapados, pues un mal cerrado de estos permite la entrada de la humedad ambiental formándose pequeñas terrones difíciles de disolver y/o hace que el medio pierda sus condiciones idóneas para su fin, al igual que algunos de sus nutrientes. Es importante además conservarlos en un estante o gabeta determinada especialmente para ellos para una mejor y rápida localización.

7.4 PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO

La inoculación de algún medio con material patógeno y las manipulaciones subsiguientes de los organismos que se cultiven constituye una tarea que requiere varios aspectos que no pueden descuidarse, pues es de vital importancia que se tenga un cierto grado de conocimiento. Una siembra de cultivo primario debe hacerse con eficacia con el mínimo de retraso, sobre el medio adecuado para los organismos que se espera se desarrollen y hacerla en forma tal que las colonias aisladas pueden ser reconocidas. En todo momento deberá recordarse que puede haber organismos patógenos en cualquier muestra y que al procesamiento y la siembra pueden producir gases. A este cultivo con varios tipos distintos de bacterias se le conoce como cultivo mixto.

Efectuando una cuidadosa inoculación en un medio sólido en placa de cultivo se obtienen colonias separadas de cada microorganismo presente, cada una de las cuales procede en la mayoría de los casos de la multiplicación de un solo microorganismo. Una sola célula da una población genéticamente homogénea y es denominada *clon*. La separación de los microorganismos nos ayuda a estudiar las características y propiedades de una especie particular de bacteria, y una vez obtenida se le conoce a este como cultivo puro.

SIEMBRA EN MEDIO SÓLIDO

Con las placas, tubos o viales ya preparados y fríos lo primero es etiquetar nuestro medio con el nombre del medio, fecha de inoculación y posteriormente el tipo de análisis y/o cultivo (es decir, mixto y puro). Para conseguir la transferencia de microorganismos de un medio a otro se debe contar con una asa o aguja la cual debe pasarse por la flama de un mechero cada que se transfiere una cepa de un medio a otro con el fin de esterilizarla . Existen varios tipos de sembrar por estrías en medios sólidos.

FIGURA 16



Al inocular la caja Petri, semiábrala y mantenga la tapa inclinada por encima del agar para proteger la superficie contra contaminación durante cada paso de la operación de sembrado. Se debe tener cuidado de no penetrar u horadar la superficie del medio durante el sembrado. En general, se trata de que la mayoría de los microorganismos que están adheridos al asa se depositen en el agar durante el trazado de las primeras estrías en la sección (1) de la superficie de sembrado y luego continuar estriando sin que se cruce las líneas. Las mejores clonas quedan aisladas en las últimas líneas (estrías) del trazado (sector 4). Al inocular en tubo se mantiene también las mismas condiciones de la caja pero aquí la estría es solamente abajo hacia arriba pero existe el sembrado por picadura para cultivos anaerobios. Recordemos que para cada tipo de cultivo existen condiciones de incubación.

SIEMBRA EN MEDIOS LÍQUIDOS

La transferencia de un inóculo de un medio líquido de cultivo a otro se lleva a cabo de la mejor forma con una pipeta Pasteur estéril en las más optimas condiciones de esterilidad al igual que con los medios sólidos. La introducción de un inóculo líquido mediante asa, alambre recto o pipeta debe ser delicada y con un mínimo de agitación. Si se va a transferir una colonia, se inclina el líquido hasta que su nivel se encuentre casi en la boca del recipiente (después de haber flameado) y se introduce el inóculo en el recipiente sobre el vidrio colocado abajo del nivel del líquido.

Recordemos que debemos tener en cuenta que en las placas después de sembradas al incubarse deben permanecer con su base arriba (volteadas), como debían haber estado desde el proceso inicial de vaciamiento, esto evita que la humedad y contaminantes de la caja caigan sobre la superficie del medio.

La mayoría de los organismos de importancia clínica se desarrollan a temperaturas de alrededor de 37°C y ésta es la cifra más usada en el incubador del laboratorio. Constituye un buen hábito el asegurarse que cada incubadora tenga una hoja de registro de temperaturas en un lugar visible y práctico.

En cuanto al tiempo de incubación, hay muchos organismos que crecerán después de una incubación de toda la noche, es decir, 18 horas, aunque es importante recordar que muchas especies no crecen en este tiempo y que puede ser necesario una incubación prolongada.

7.5 VALIDACIÓN

Considerando la importancia que representa el control de calidad de los medios de cultivo, herramienta clave en las determinaciones microbiológicas, la validación de estos es irrefutable pues la confianza de nuestros resultados estará dado en su gran mayoría aquí.

La validación de los medios de cultivo debe aplicarse a cada lote que se utilice en las determinaciones microbiológicas. Y debe contar con los siguientes puntos:

A.- Debe estar identificado y contar con una hoja de registro que contenga como mínimo los siguientes datos: (formato No. 1)

MEDIOS

-Nombre

-Marca

-Número de lote

-Fecha de adquisición

Medios Sin Preparar

-Fecha de apertura

-Observaciones

- Nombre
- Marca
- Número de lote
- Número de codificación Medios Preparados
- Datos de preparación
- Nombre del preparador

MATERIAL

B.- En la preparación de los medios de cultivo debe usarse material limpio y seco verificando que no queden residuos ácidos o alcalinos, sin olvidar su esterilización.

PREPARACIÓN

C.- Es recomendado siempre que sea posible utilizar medios deshidratados comerciales y respetar estrictamente las recomendaciones indicadas del fabricante.

PESADA

D.- En una balanza calibrada pesar cuidadosamente y con precisión la cantidad de polvo requerido, tapar el frasco inmediatamente y regresarlo a su lugar.

HIDRATACIÓN

E.- Colocar aproximadamente la mitad del volumen requerido de agua recién deshidratada o desionizada en recipientes escrupulosamente limpios y cuya capacidad sea por lo menos 2.5 veces mayor del volumen de medio que se desea preparar; agregar el medio de cultivo pesado dejar reposar durante 10 a 15 minutos y proceder a completar el volumen de agua.

Calentar el medio de cultivo si sus instrucciones de preparación así lo indican, utilizando baño de agua, parrilla eléctrica o ala flama del mechero sobre una rejilla de asbesto, agitando frecuentemente y considerando siempre las consideraciones del fabricante.

pH

F.- Para esta determinación emplear potenciómetros calibrados. Determinar el pH del medio de cultivo cuidando que el electrodo quede sumergido en el seno del medio, a la temperatura indicada por el fabricante, cuando ésta no especifique en el marbete, hacer la determinación a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, de ser necesario ajustar el pH del medio con soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.5M según se requiera.

ESTERILIZACIÓN

G.- Hay que establecer los patrones de carga y los tiempos de exposición para esterilizadores a utilizar por calor húmedo del laboratorio. Distribuir en los tubos o matraces la cantidad necesaria del medio de cultivo limitando el volumen a las $\frac{3}{4}$ partes de la capacidad del recipiente. Cubrir los recipientes con tapones metálicos, de bakelita o de algodón. Antes de que los frascos y/o tubos sean sometidos al proceso de esterilización, verificar que los tapones de bakelita estén a medio cerrar y proteger con papel, todo aquel recipiente provisto de tapón de algodón. Al concluir el proceso de esterilización apretar los tapones de bakelita.

ADITIVOS

H.- Cualquier ingrediente termolábil debe obtenerse e incorporarse en condiciones asépticas al medio de cultivo estéril (considerando el volumen final) a una temperatura no mayor a los 50 °C. Para medios de cultivo sólidos es importante que el aditivo se encuentre a la temperatura ambiente para evitar la gelificación del medio.

ENVASADO

I.- Cuando se requiere preparar el medio de cultivo en placas, distribuir en campana de flujo laminar o en la zona bacteriológica del mechero o volúmenes de 15 a 20 ml en cajas Petri estériles y a temperatura no mayor de 50 °C, evitando tocar con los dedos la boca del recipiente que contiene el medio.

Eliminar el exceso de humedad de la placa por cualquiera de los métodos que se indican a continuación (colocándolas con el agar hacia arriba):

- a) En estufa a 50 °C durante 2 horas
- b) En estufa a 37 °C durante 4 horas
- c) Temperatura ambiente durante 16 horas.

ALMACENAMIENTO

J.- Anotar en los recipientes que contienen los medios de cultivo por lo menos los siguientes datos:

- Nombre del medio
- Fecha de preparación
- Fecha de caducidad

Almacenar los medios de cultivo en refrigeración (2-8°C), envasar en recipientes con tapón de rosca siempre que sea posible. Las placas deben almacenarse a esta misma temperatura, envueltas en papel aluminio o dentro de bolsas de plástico o recipientes de poliestireno. No utilizar medios de cultivo preparados sólidos o líquidos que muestren signos de deshidratación o evaporación respectivamente.

DOCUMENTACIÓN

K.- Hacer anotaciones en los formatos respectivos de control de calidad de medios de cultivo preparados, la cantidad pesada del polvo y el volumen de agua agregada (formato No. 2).

CONTROL DE CALIDAD

Cada lote de medio de cultivo debe someterse a las siguientes determinaciones:

pH.- Esta se efectuará a 25 °C usando potenciómetro validado.

Prueba de esterilidad.- Se recomienda someter a esta prueba el 4% de las unidades preparadas incubando a 35-37 °C (24-48 horas) o bien a 20-25 °C (5-7 días); la incubadora debe estar validada.

Prueba de promoción de crecimiento.- Los microorganismos empleados en las pruebas de promoción de crecimiento se selecciona dependiendo el tipo de medio. Por ejemplo los medios de cultivo selectivos y diferenciales como el agar EMB, deben probarse con un microorganismo que fermente la lactosa (*E. coli*) uno que no la femente (*Salmonella sp.*) y otro que sea inhibido (*S.aureus*).

Si el medio pretende inhibir específicamente un cierto organismo o a un grupo de ellos, incluirlos en el ensayo (por ejemplo; organismos coliformes en agar verde brillante o en agar SS), en tales casos debe observarse tanto la intensidad del desarrollo de los microorganismos deseables como las características de sus colonias (tamaño, color).

Para determinar el grado de inhibición que muestre el lote ensayado, incluir simultáneamente en la prueba un medio no inhibitorio como el agar soya tripticaseína (AST).

Estabilidad.- Periódicamente efectuar los puntos anteriores a los medios de cultivo preparados y almacenados, tanto para establecer si las condiciones de almacenamiento fueron apropiadas como para determinar la vida útil de cada medio de cultivo (caducidad).

CITAS TEXTUALES

- 2.-BAKER J.and M. R. Breach Manual de Técnicas de Microbiología Médica, Editorial Acribia, S. A., Zaragoza España 1990
- 3.-BAYLEY W. Rober, Elvin G. Scott, Diagnóstico Microbiológico, Buenos Aires Argentina, Edit. Médica Panamericana, 1989, pág. 21- 29, 65 – 68
- 5.-BRADSHAW, L. Jack Dr., Microbiología de Laboratorio Universidad Estatal de California en Fullerton E.U.A., México 1976, Edit. Manual Moderno, S.A., pág. 10 –12
- 7.- BRYAN, H. Arthur., Ccharles A. Bryan, Bacteriología Principios y Prácticas, Edición Compañía Editorial S. A., Barcelona España 1971
- 11.-DAVIS, Bernard D. W.D. Renato Dulbecco M.D. and Herman N. Eisen, Tratado de Microbiología Barcelona España 1978, 2ª Edic. Salvat Editores, S.A., pág. 1475 – 1489
- 13.-DICKINSON, Becton C. Medios de Cultivo, Materiales e Instrumentos para Laboratorio de Microbiología, Baltimore Bilological Laboratory Inc., 1995, pág. 262
- 16.-FENEGOLD, Sidney M., Ellen J. Barón, Diagnóstico Microbiológico, Buenos Aires, Argentina 1989, Edición Edit. Médica Panamericana, pág. 21 - 26, 65 – 68
- 21.- GUÍA Oficial de Validación de la S.S.A. "Preparación de Medios de Cultivo" México 1991 pág. 3 – 47
- 23.- JARVIS D. Bacteriología Clínica Básica, Editorial El Manual Moderno, S.A. México, 1976 pág. 70 - 96
- 24.-JENSEN, M. Marcus and Donald N. Wrigth, Introducción a la Microbiología Médica Prentice-Hall Hispanoamericana, S. A.,México 1987, pág. 82 – 125
- 31.-NAJERA, Alba N. Franco.Tesis : Validación de Medios de Cultivo, UNAM, México, 1990
- 35.- SAVIN Consuelo Ma. de la Luz., Judith Márquez y Luis Bojorques, Biología Interacción de Experimentos e Ideas, Consejo Nacional para la Enseñanza de la Biología, A.C., Editorial Limusa México, 1976 pág. 68 - 76, 157 - 159, 179 - 182
- 38.- VILLE, Claude A. Biología Harvard University, Edición Edutorial Interamericana S.A. México 1984 pág. 25 - 27

CAPITULO VIII

SEGURIDAD EN EL LABORATORIO MICROBIOLÓGICO

Los laboratorios microbiológicos deben presentar una seguridad especial, pues el trabajar con microorganismos representa un riesgo para el estudiante, profesor, analista y toda aquella persona que labore en este, debido a los agentes infecciosos que pueden contener. Además de los riesgos por infección los laboratorios microbiológicos también están expuestos a todos los riesgos asociados con cualquier ambiente como incendios, riesgos eléctricos, químicos, situaciones ambientales, materiales radiactivos, mal funcionamiento de los equipos y peligros dependientes de desastres naturales.

Cada sección del laboratorio debe contar con un manual y letreros visibles de seguridad que contenga información sobre la conducta a seguir en caso de incendio, inundación, terremoto u otro desastre natural, así como los pasos a seguir que deben realizarse frente a situaciones que representan un riesgo. Un buen sistema para la seguridad es que todo el personal relacionado con el laboratorio este familiarizado con las normas de seguridad y realizar periódicamente ejercicios de seguridad sin anuncio previo. Al variar las situaciones de riesgo (hipotéticas) se permite que el personal tenga la oportunidad de comprobar el conocimiento y la conducta apropiada en una emergencia.

Es importante que antes de trabajar en un laboratorio microbiológico, cuando existen personas nuevas en esta área se le proporcione toda la información adecuada, tal como manuales, folletos etc., en los cuales la información sea clara y fácil de comprender para cualquiera. Tales folletos deben incluir códigos de colores, listas de reactivos y medios, esquemas o fotografías que indiquen la localización de equipos, dispositivos de seguridad como extintores de fuego, lava ojos, regadera de presión, salidas de emergencia, etc. Es también recomendable hacer un recorrido físico que de a conocer todo este sistema.

8.1 REGLAS BÁSICAS DE SEGURIDAD E HIGIENE

- 1.- Siga las instrucciones que se le den. No improvise
- 2.- Reporte a sus profesores los actos o condiciones inseguras de su área de trabajo.
- 3.- Reporte cualquier accidente que sufra, por mínimo que parezca durante el desarrollo de su análisis.
- 4.- Aplicar el principio de ORDEN: "Un lugar para cada cosa y cada cosa en su lugar".
- 5.- Usar los equipos y herramientas para lo que fueron diseñados, y cerciórese de que estén en buenas condiciones de trabajo.
- 6.- Usar o ajustar solamente los equipos para los cuales esté capacitado y autorizado.
- 7.- Usar equipo de protección personal.
- 8.- Evitar bromas y retozos durante las horas de trabajo.
- 9.- Evite usar joyas, alhajas, colgantes o ropa suelta.
- 10.- No fumar.
- 11.- Respetar y obedecer los señalamientos.
- 12.- Mantener libre de obstáculos los pasillos y puertas de salida y evitar obstruir o dañar el equipo contra incendio.
- 13.- Evitar correr o gritar.
- 14.- Los líquidos inflamables deben manejarse en recipientes de seguridad.
- 15.- Los desechos como, reactivos, solventes corrosivos deben ser almacenados y controlados en una área exclusiva de residuos. NUNCA TIRARLOS AL DRENAJE O A LA BASURA GENERAL.
- 16.- Los desechos de medios de cultivo deben desactivarse (esterilizándolos)

8.2 VESTIMENTA, EQUIPO Y COMPORTAMIENTO

El laboratorio microbiológico presenta muchos riesgos para personas desprevenidas y no entrenadas, por lo tanto, el acceso debe estar limitado y las visitas deben ser mínimas y contarán con la vestimenta que porta el personal que ahí labore. Tal vestimenta es: Bata blanca, zapatos antiderrapantes, gogloes, cofia, cubrebocas guantes desechables, etc. vestimenta que deben quitarse y cambiar a diario después de una jornada de trabajo, la cual se esterilizará.

En cuanto al equipo a utilizar, es determinante de acuerdo a la actividad a realizar y/o al tipo de microorganismo a trabajar, entonces se trabajará en áreas que cuenten con sistemas de circulación de aire que haya pasado por gabinetes de seguridad biológica.

El comportamiento dentro de un laboratorio microbiológico guarda ciertas reglas pues es también un factor indispensable, dentro de un laboratorio no se permite ingerir alimentos, usar joyería, maquillaje, cabello suelto, barba y bigote, uñas largas.

8.3 LIMPIEZA Y SALUD

Aunque el equipo de protección personal es una barrera entre un riesgo y la persona que los usa, a fin de evitar un contacto con el material tóxico para la salud, el baño diario es un complemento para prevenir infecciones y enfermedades. El evitar tener en los casilleros herramientas, equipos de protección personal o alimentos.

8.4 IDENTIFICACIONES Y LETREROS

Las identificaciones de todos y cada uno de los reactivos, medios, solventes, equipos, áreas y contenido de cajones así como la

localización por medio de letreros del material de vidrio es el punto primordial del laboratorio que marca la seguridad de este.

8.5 DOCUMENTACIÓN

El control escrito de las labores diarias realizadas en el laboratorio nos ayuda a recordar con seguridad los reactivos y medios utilizados, así como el equipo y el lote de cepa microbiana, en caso de un resultado erróneo (falso positivo o negativo) o una mezcla de resultados. Tal documentación debe archivar en orden cronológico y conservarse por lo menos tres años.

Un laboratorio seguro se logra con el esfuerzo de todos los que trabajan con en él y entre otras reglas deben también mantenerse siempre cajones cerrados de archiveros, estantes y escritorios. Hay que evitar cables cruzados porque son un peligro para tropezones y caídas. No subirse en sillas con ruedas para alcanzar objetos en las alturas. Apagar los equipos eléctricos que no se estén usando y desconéctelos cuando abandone el laboratorio si este se queda solo.

8.6 ¿QUE HACER Y QUE NO HACER EN CASO DE UN ACCIDENTE?

Todo accidente o lesión, por leve que sea, debe ser reportado de inmediato a su profesor de inmediato; de esta manera se tendrán varias ventajas, entre estas:

Se tornara rápida acción para atender lesiones o pérdidas materiales si las hubiera y se hará un análisis o investigación par evita la repetición.

En caso de haber alguna lesión, siga estas indicaciones:

a) No mueva a la víctima, sólo en caso de peligros extremos como un incendio, gases tóxicos en el ambiente, riesgos de derrumbes, o cualquier condición que por su naturaleza podría poner en riesgo la vida de la persona lesionada.

- b) Mantenga acostada a la víctima, por lo menos hasta que se haya determinado la lesión y la magnitud de ésta, y se haya creado la confianza suficiente con la persona lesionada para que no exista pánico. Solicitar la ayuda necesaria o permita que otros proporcionen los primeros auxilios, si no los sabes hacer.
- b) Prevenga el shock, manteniendo a la víctima en reposo y abrigada.
- c) No intente dar primeros auxilios o atenciones para los cuales no esté preparado.
- d) No trates de cambiar de posición las partes o huesos rotos.
- e) No permitas que el accidentado que haya recibido respiración artificial, se levante de inmediato.
- f) No trates de volver en sí a una persona sacudiéndola o dándole líquidos por ninguna vía (oral, agua en la cara).
- g) No usar torniquetes a menos que sepa hacerlo y sea una necesidad crítica.
- h) No usar un pañuelo mojado en vez de un respirador contra gases tóxicos.
- i) Nunca abandone a un lesionado hasta que haya conseguido ayuda de un médico.
- j) Mantenga la calma, tome el liderazgo de la situación y aleje a los curiosos.
- k) En caso de ingestión accidental, no provoque el vomito si no conoce sus consecuencia.
- l) Tenga bien ubicados los lava ojos y regaderas de presión.

CITAS TEXTUALES

29.-MORENO, B. Guillermo, Manual Básico de Seguridad, Higiene y Protección Ambiental
Bristol Myers Squibb de México, S.A., México, 1895 pág. 4 – 14

CAPITULO IX

CONCLUSIONES

1.- La importancia del concepto Control de Calidad debe en cualquier nivel incluirse como una forma de trabajo ordenada, clara y precisa que trae con sígo resultados palpables. Es importante a demás tener claro que para alcanzar y/o tener dicho control se debe comenzar y terminar con calidad para lograr resultados satisfactorios y no sólo dentro de un laboratorio.

2.- Al lograr resultados satisfactorios en un proceso de Calidad y estos son reproducibles, al aplicar un sistema de trabajo que se ha concebido desde sus raíces en forma metódica también se alcanza la validez y confianza para comprobarlos.

3.- El equipo que se encuentra en un laboratorio microbiológico concentra varios preguntas para quien por primera vez lo utiliza, por tanto, conjuntar la información básica en cuanto a su utilización, sus partes, su seguridad, su limpieza entre otros aspectos en un solo manual ayuda a conocerlo y manejarlo en un tiempo corto.

4.- Al contemplar los aspectos que rodean una buena limpieza de áreas de trabajo se distinguen las diferencias para los limites microbiológicos entre materiales, reactivo, medios de cultivo, equipos y usuarios.

5.-El conocimiento de la utilización de los medios de cultivo es muy variado, pero en muchas ocasiones no se conoce lo básico, como principio se conocen únicamente las cajas Petri que contienen agar pero al introducirse al mundo de la microbiología al diferenciar los tipos de microorganismos se diferencian los tipos de medios de cultivo concepto que se menciona y/o se utiliza únicamente en el laboratorio, entonces se debe conocer la gran variedad de medios, sus muy diferentes composiciones y usos. Por tanto, el incluir esta información amplia los conceptos básicos para su introducción.

6.- La introducción al mundo de la microbiología nos lleva a comprender la necesidad de trabajar con ese conocimiento de limpieza, cuidado, control, calidad y sobre todo con seguridad. Seguridad en el manejo del equipo, de los reactivos, de los medios de cultivo, de las cepas microbianas, y del comportamiento en el laboratorio. Seguridad que nos lleva a buenos resultados en el trabajo.

7.- La información de este manual nos introduce a los conceptos y principios que se deben conocer para que nuevos alumnos trabajen con calidad al iniciar a su enseñanza en el laboratorio microbiológico pues contempla la información útil y precisa para que se conozca todo aquello que se maneja dentro de éste.

CAPITULO X

SUGERENCIAS

El concepto Control de Calidad no debe darse como una materia más dentro del programa de estudios para la formación de los alumnos de la carrera de Químico-Farmaco-Biología. Como una sugerencia se debería de impartir como una unidad dentro de todas las materias de la carrera, pues no sólo tiene aplicación al laboratorio de microbiología, tiene aplicación en todo aquello que a un quimicofarmacobiólogo le rodea de principio a fin en su vida profesional.

En la formación de nuevos alumnos dentro del laboratorio, en ocasiones se deduce que conocen reglas, equipos, técnicas, conceptos, definiciones, etc.; y se trabaja con esta idea y no se profundiza, ni se toca el tema, dejando dudas. Por tal razón se sugiere una introducción lo más completa posible a esos conceptos que darán seguridad, confianza y libertad para abarcar temas más profundos y sean mejor comprendidos al establecer lenguaje común para lograr una buena comunicación entre el asesor y el alumno.

Por último se sugiere que no se de por hecho por más obvio que se parezca que un nuevo alumno conozca estos conceptos, pues el mundo de la microbiología es tan extenso que siempre necesita asesoría, supervisión, apoyo y sobre todo un buen guía que desde sus inicios lo encamine a trabajar con Calidad.

BIBLIOGRAFIA XI

- 1.-ASSOCIATION, for the Advancement of Medical Instrumentation National Standards and Recommended Practices for Sterilization, Arlington Virginia E.U.A., 1988 1ª Edición pág. 21-25, 39 - 46, 71 - 90, 181 - 189
- 2.-BAKER J. and M. R. Breach Manual de Técnicas de Microbiología Médica, Editorial Acribia, S. A., Zaragoza España 1990
- 3.-BAYLEY W. Rober, Elvin G. Scott, Diagnóstico Microbiológico, Buenos Aires Argentina, Edit. Médica Panamericana, 1989, pág. 21- 29, 65 – 68
- 4.-BIDOU, Dora Beatriz. Juan Carlos Grupillo, Fundamentos y Técnicas de Esterilización, Control de Materiales y Esterilización, Editorial Médica Panamericana. S.A., México, 1977
- 5.-BRADSHAW, L. Jack Dr., Microbiología de Laboratorio Universidad Estatal de California en Fullerton E.U.A., México 1976, Edit. Manual Moderno, S.A., pág. 10 –12
- 6.-BREACH, M.R. Westminster Londres, Esterilización Métodos de Control, México, 1985 Edit. El Manual Moderno, S.A., pág. 9 - 94
- 7.-BRYAN, H. Arthur., Charles A. Bryan, Bacteriología Principios y Prácticas, Edición Compañía Editorial S. A., Barcelona España 1971
- 8.-CARLETON Frederick J. James P. Agalloco, Validation of Aseptic Pharmaceutical Processes, Merck Derkker, Inc 1986
- 9.- CASTAÑEDA, Eriberto Ing., M. en C. Alba Medina Mayer, Curso: Evaluación y Validación de Sistemas Críticos en Areas Asépticas, Asociación, Farmacéutica Politécnica A.C. México 1988.
- 10.-COURIEL, David Benito José de Jesús Alvarado, Validación de Procesos Farmacéuticos, Asociación Farmacéutica Mexicana, México, 1982 pág. 78
- 11.-DAVIS, Bernard D. W.D. Renato Dulbecco M.D. and Herman N. Eisen, Tratado de Microbiología Barcelona España 1978, 2ª Edic. Salvat Editores, S.A., pág. 1475 – 1489
- 12.-DENER an Braird. Ellis Horwood, Guide to Microbiological Control in Pharmaceutical Series in Pharmaceutical Technology School of Health Sciences, Liverpool Polytechnic 1992, pág. 182 - 213, 220 –240
- 13.-DICKINSON, Becton C. Medios de Cultivo, Materiales e Instrumentos para Laboratorio de Microbiología, Baltimore Biological Laboratory Inc., 1995, pág. 262
- 14.-FARMACOPEA de los Estados Unidos Mexicanos Quinta Edición México 198, pág. 477, 201,
- 15.-FEIGENBAUM, V., Control Total de la Calidad, Pittsfield Massachusetts, Compañía Editorial Continental S.A., México, 1987 3ª Edición, pág. 34 – 39
- 16.-FENEGOLD, Sidney M., Ellen J. Barón, Diagnóstico Microbiológico, Buenos Aires, Argentina 1989, Edición Edit. Médica Panamericana, pág. 21 - 26, 65 – 68
- 17.- GUÍA de Prácticas Adecuadas de Manufactura para Cuartos Limpios CIPAM, Monografía Técnica No. 1, México 1990

- 18.-GUÍA Oficial de Validación de S.S.A. "Áreas asepticas, hornos y autoclaves" México, D.F. 1990 pág. 2-21
- 19.- GUÍA Oficial de Validación de la S.S.A., "Hondos y Autoclaves", México 1991 pág. 2 – 14
- 20.- GUÍA Oficial de Validación de la S.S.A. "Filtros Asépticos y Sistemas de Generación de Agua Calidad Inyectable" México 1991 pág. 3 - 12
- 21.- GUÍA Oficial de Validación de la S.S.A. "Preparación de Médicos de Cultivo" México 1991 pág. 3 – 47
- 22.-HERNÁNDEZ, Aragón Ma. Tereza. Tesis : Establecimiento de un Sistema de Control de Calidad en el Laboratorio de Microbiología Clínica UNAM, México, 1984 pág. 81
- 23.- JARVIS D. Bacteriología Clínica Básica, Editorial El Manual Moderno, S.A. México, 1976 pág. 70 - 96
- 24.-JENSEN, M. Marcus and Donald N. Wriqth, Introducción a la Microbiología Médica Prentice-Hall Hispanoamericana, S. A.,México 1987, pág. 82 – 125
- 25.-JOURNAL, of Australia Adecade of Legume Quality Control in Australia, Institute of Agriculture Science, Vol. 35 pag. 27 - 39
- 26.- KEMMER N. Frank and Jonh McCallion, Manual del Agua. Su Naturaleza, Tratamiento y Aplicaciones, Nalco Chemical Company, Editorial McGraw-Hill, Tomo I México 1993
- 27.- LÓPEZ, Mareen Luz Maria Dr. Niveles de Seguridad Bilógica, Comisión de Seguridad Madrid España, 1996 Pág. 1-2
- 28.- MARTÍNEZ, M. Martha L. Ma. de los Dolores Campos E., Curso : Procesos de Sanitización y su Validación, Instituto Mexicano de Capacitación de la Industria Farmacéutica y Química Farmacéutica, México 1997
- 29.-MORENO, B. Guillermo, Manual Básico de Seguridad, Higiene y Protección Ambiental Bristol Myers Squibb de México, S.A., México, 1895 pág. 4 – 14
- 30.-MUÑOZ, Mercado Martha Patricia, Tesis: Diferentes Métodos para el Cálculo del Tiempo de Esterilización por Calor para Alimentos Procesados UNAM,México, 1990
- 31.-NAJERA, Alba N. Franco.Tesis : Validación de Medios de Cultivo, UNAM, México, 1990
- 32.-RAGAYNON, Priego Annabella.Tesis : Planeación, Organización y Control de un Laboratorio de Análisis Clínico Privado UNAM, México 1987 pág. 140
- 33.-REVISTA Mexicana de las Ciencias Validation: fundation of GMP Pharmaceutical Engiening, Vol. 10 No. 3 Pág. 44, May- Jun 1996
- 34.-RUJZ Avilés David Q.B.P. CORTEZ Gómez Alicia I.B.Q.,Manuales de Laboratorio Instituto Politécnico Nacional,Escuela Nacional de Ciencias,México 1ª Edición 1983