
DOCUMENTO ORIENTADOR PARA PRUEBAS DE PROVOCACIÓN MICROBIOLÓGICA EN AUTOCLAVES UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE RESIDUOS GENERADOS POR LA ATENCIÓN DE LA SALUD

INTRODUCCIÓN

Dos de los componentes del Proyecto Global del PNUD/FMAM sobre residuos generados por la atención de la salud consisten en la comprobación de las tecnologías alternativas a la incineración para el tratamiento de este tipo de residuos, de las cuales el autoclave es la más comúnmente utilizada. El presente documento incluye un protocolo para el desarrollo de pruebas de provocación microbiológica para los ensayos de validación de autoclaves de desplazamiento por gravedad o de vacío utilizados para el tratamiento de residuos médicos.

OBJETIVO DEL PROTOCOLO DE ENSAYO

El objetivo de este protocolo es demostrar la capacidad de los autoclaves descritos anteriormente para tratar residuos médicos de manera eficaz de acuerdo con los estándares de tratamiento aceptados.

PRINCIPIOS BÁSICOS Y ENFOQUE GENERAL

La eficacia del tratamiento significa la capacidad del autoclave para alterar los residuos de manera tal de eliminar su potencial como vector de enfermedades por completo o disminuirlo en gran medida. Los términos desinfección y esterilización son de uso frecuente en los debates sobre eficacia del tratamiento. La desinfección puede definirse como la reducción o eliminación de microorganismos patógenos con el objetivo de minimizar el potencial de transmisión. La esterilización es la destrucción total de todo tipo de microorganismo. Dado que es difícil establecer la destrucción total de los microorganismos, la esterilización del instrumental médico y quirúrgico suele expresarse como una reducción igual a 6 en escala logarítmica de un microorganismo determinado que equivale a una millonésima (0,000001) de probabilidad de supervivencia de la población microbiana.

El sistema de clasificación de STAATT, cuando se lo utiliza en reemplazo de los términos desinfección o esterilización, se refiere a niveles de “inactivación microbiana” para el caso específico del tratamiento de residuos generados por la atención de la salud. La

organización se estableció con el fin de definir variables para la evaluación del desempeño de las tecnologías para el tratamiento de este tipo de residuos. El estándar internacional de inactivación microbiana para el tratamiento de residuos generados por la atención de la salud según los criterios propuestos por la STAATT es de Nivel III:

Nivel III - Inactivación de bacterias vegetativas, hongos, virus lipofílicos/hidrofílicos, parásitos y micobacterias a un nivel de reducción mayor o igual a 6 Log₁₀; e inactivación de esporas de *g. stearothermophilus* y de esporas de *b. atrophaeus* a un nivel de reducción mayor o igual a 4 Log₁₀.

Los indicadores microbiológicos representativos comúnmente utilizados para evaluar la conformidad con dicho estándar son bacterias *mycobacterium phlei* o *mycobacterium bovis* (BCG) a un nivel de reducción mayor o igual a 6 Log₁₀; y esporas termorresistentes de *geobacillus stearothermophilus* o *bacillus atrophaeus* a un nivel de reducción mayor o igual a 4 Log₁₀.

Las esporas de *geobacillus stearothermophilus*, anteriormente denominadas *bacillus stearothermophilus*, son endosporas inactivas no patogénicas capaces de soportar las altas temperaturas del tratamiento con vapor así como también con calor seco. Las esporas de *bacillus atrophaeus*, anteriormente denominadas *bacillus subtilis* var. *niger*, son también resistentes a la humedad, el calor seco y la inactivación química. El cuadro 1 contiene una lista de los principales tipos de microorganismos, sin incluir priones, según su resistencia al proceso de desinfección química; se observa el mismo patrón en los procesos de desinfección térmica. Debido a la alta resistencia de las esporas bacterianas, en general, sólo se requiere realizar ensayos de validación con el método de referencia (esporas de *geobacillus stearothermophilus* o *bacillus atrophaeus*) para comprobar la eficacia de los autoclaves destinados al tratamiento de residuos.

Cuadro 1. Microorganismos en orden *descendiente* según su resistencia a la desinfección química

MICROORGANISMOS	EJEMPLOS
ESPORAS BACTERIANAS [MAYOR RESISTENCIA]	<i>GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS</i> , <i>BACILLUS ATROPHAEUS</i> , <i>CLOSTRIDIUM SPOROGENES</i>
PARÁSITOS EN FASE QUÍSTICA	<i>QUISTES DE CRYPTOSPORIDIUM</i>
MICOBACTERIAS	<i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> VAR. <i>BOVIS</i> , MICOBACTERIA NO TUBERCULOSA
VIRUS NO LIPÍDICOS O PEQUEÑOS	VIRUS DE POLIO, VIRUS DE COXSACKIE, RINOVIRUS
HONGOS	<i>TRICHOPHYTON</i> SPP., <i>CRYPTOCOCCUS</i> SPP., <i>CANDIDA</i> SPP.
PARÁSITOS EN FASE NO QUÍSTICA	
BACTERIAS VEGETATIVAS	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> , <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> , <i>SALMONELLA CHLOERAESUIS</i> , ENTEROCOCCI
VIRUS LIPÍDICOS O MEDIANOS [MENOR RESISTENCIA]	VIRUS DE HERPES SIMPLEX, CITOMEGALOVIRUS, VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO (VSR),

	VIRUS DE HEPATITIS B, VIRUS DE HEPATITIS C, VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)
--	--

Fuente: *Sterilization, Part 1: Sterilization in Health Care Facilities*, Arlington: Asociación para el Desarrollo del Instrumental Médico (2006)

El método tradicional de prueba para los sistemas de esterilización por calor húmedo tales como los autoclaves se realiza con endosporas que se colocan sobre tiras de papel seco protegidas con sobres de papel glassine. Después del procesamiento, se retira la tira cuidadosamente del sobre y se la coloca en un recipiente con un medio estéril. Dentro de las 24 horas, se la inocula en forma aséptica en 5,0 ml de un medio de dilución de caldo digerido de caseína-soja. Este proceso debe realizarse con sumo cuidado para evitar la introducción de bacterias ambientales en el medio. Luego, se incuba la tira con el medio de cultivo durante un mínimo de 48 horas a 30°C para *bacillus atrophaeus* y a 55 °C para *geobacillus stearothermophilus* para permitir que crezcan y se reproduzcan las esporas sobrevivientes. La turbidez del medio indica la falla del tratamiento con el autoclave.

En la actualidad se utiliza un método más sencillo, que recomendamos en este documento orientador. Se basa en el uso de un indicador biológico autocontenido (SCBI) que consiste en una tira de esporas dentro de un recipiente que a su vez contiene un medio de cultivo dentro de una cápsula interna precitada; se utiliza un tapón perforado junto con un filtro hidrófobo que actúa como barrera bacteriana. El recipiente se coloca dentro de una carga testigo y se recupera una vez finalizado el tratamiento. Luego, se presiona el recipiente hasta romper la cápsula interna y así permitir que el medio de cultivo se mezcle con la tira de esporas procesada. Finalmente, se lo incuba durante 24 ó 48 horas a una temperatura predeterminada. El indicador biológico autocontenido para los autoclaves que se utilizan en el tratamiento de residuos contiene una cantidad predeterminada de esporas (concentración 10^4) de modo que una prueba que arroja un resultado negativo corresponde a una reducción igual a 4 Log₁₀. Los indicadores biológicos autocontenidos con indicador de pH muestran la supervivencia de las esporas y por ende, el resultado positivo de la prueba (falla del proceso) mediante un cambio de color en el indicador. Otro método disponible se basa en el uso de cápsulas de vidrio herméticas que contienen en su interior medio de cultivo e indicador de pH. Cada cápsula, que contiene una población de endosporas predeterminada, debe mantenerse en un lugar refrigerado hasta ser utilizada y el período de incubación requerido es de 48 horas. La presencia de crecimiento se confirma por la turbidez del medio y/o el cambio de color del indicador. Otro sistema de indicador biológico detecta la actividad enzimática detectada en la espora bacteriana. Se ha demostrado que la respuesta enzimática es equivalente a capacidad que posee la espora de multiplicarse. Este método detecta la fluorescencia producida por un indicador positivo. Debido a su alto grado de sensibilidad, este método produce resultados en un espacio de 1 a 3 horas, lo que se correlaciona con un período de incubación de siete días.

Para los ensayos de validación inicial de un autoclave nuevo, debe ajustarse el ciclo del proceso hasta que al menos tres pruebas consecutivas cumplan con los criterios de reducción logarítmica

exigidos. Los parámetros operativos correspondientes a las pruebas exitosas (tiempo de exposición, temperatura o presión) deberán documentarse. Las condiciones operativas para todas las cargas futuras deberán respetar dichos parámetros y, a su vez, deberán ser registradas.

El enfoque utilizado en el presente protocolo consiste en una prueba de provocación microbiológica mediante el empleo de indicadores biológicos autocontenidos de esporas de *geobacillus stearothermophilus* embebidas en portadores que a su vez se colocan dentro de una bolsa con residuos para demostrar una reducción de las esporas bacterianas ≥ 4 en escala logarítmica.

PROTOCOLO DEL ENSAYO

General

A continuación se detallan los lineamientos generales correspondientes al protocolo del ensayo:

- El autoclave debe manejarse en condiciones operativas normales.
- Las pruebas deben realizarse sobre residuos típicos de un establecimiento de la salud en particular. Debe prestarse suma atención a la presencia de cortopunzantes y desechos de cultivos de laboratorio. Las pruebas deben realizarse utilizando los mismos contenedores o bolsas normalmente utilizados en el establecimiento y los mismos deben cerrarse en la forma habitual.
- La bolsa testigo debe colocarse y apilarse en el sistema de tratamiento como se lo hace habitualmente. En caso de tratar múltiples bolsas, los indicadores biológicos deben colocarse en aquellas bolsas en las que el tratamiento sea más difícil.

Personal

El personal responsable de realizar la prueba debe estar específicamente capacitado para tal fin. La prueba puede estar a cargo de un operador de autoclave siempre y cuando éste haya sido debidamente capacitado y esté supervisado por un director del establecimiento.

EPP

Al realizar pruebas sobre residuos infecciosos, deberán respetarse los procedimientos de seguridad en el trabajo. Debe utilizarse el siguiente equipo de protección personal (EPP) al abrir bolsas con residuos médicos, al colocar los portadores dentro de las mismas, al cerrarlas y al colocarlas dentro del autoclave: guantes de alta resistencia, barbijo, gafas protectoras (o máscara para proteger la cara), calzado con suela rígida (o botas) y delantal (o bata protectora) sobre la propia vestimenta. Por otra parte, debe utilizarse el siguiente equipo de protección personal al retirar los portadores de las bolsas: guantes de alta resistencia, calzado con suela rígida (o botas), delantal (o bata protectora) sobre la propia vestimenta y máscara para la cara para protegerse del vapor,

según resulte necesario. Todo el equipo de protección personal deberá limpiarse luego de su uso.

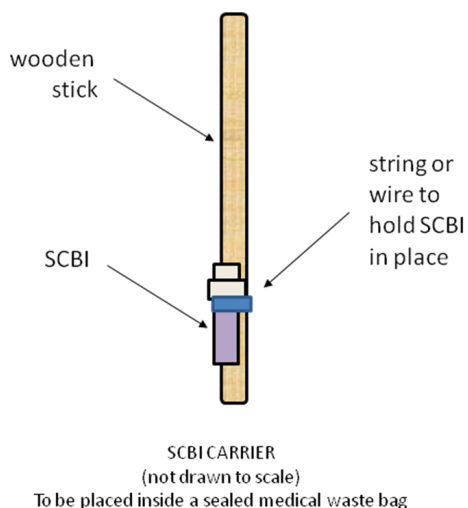
Materiales

Los indicadores biológicos autocontenidos (SCBI) deben cumplir con las siguientes especificaciones (ver ejemplos en el Apéndice A):

- Indicador biológico: esporas de *geobacillus stearothermophilus*
- Concentración: $\geq 1 \times 10^4$ ufc/ml
- Valor D: más de 1.5 minutos a 121°C
(Se sugiere un Valor D > 2 min si está disponible)

En caso de que las cargas sometidas a tratamiento en el autoclave contengan varias bolsas o contenedores, deberán utilizarse tres SCBI y un control para realizar la prueba de provocación. Cada SCBI deberá estar rotulado para distinguir entre los indicadores de prueba y el control. Deben colocarse cada uno de los tres SCBI en bolsas diferentes, una de las cuáles será ubicada en la parte central inferior de la pila. Si se somete a tratamiento una sola bolsa por carga, se utilizará sólo un SCBI y un control para realizar la prueba de provocación.

El siguiente gráfico muestra cómo debe prepararse el portador.



Procedimiento

Deberá cumplirse el siguiente procedimiento para la colocación, retiro e incubación:

- A) Seleccione aleatoriamente tres bolsas individuales cargadas, representativas del tamaño promedio de las bolsas de residuos generados por la atención de la salud. Ábralas con cuidado y coloque un portador dentro de cada una de ellas. Coloque la varilla de madera de manera tal que el SCBI quede ubicado en el medio. Si se encontraran otras bolsas en el interior de la bolsa

- principal, debe colocar el portador dentro una de ellas. A continuación, cierre las bolsas del mismo modo en el que las encontró al principio.
- B) Coloque las tres bolsas en la parte central inferior, media y superior del lote de residuos dentro del autoclave. Separe el control y manténgalo a temperatura ambiente.
 - C) Una vez que se haya cargado el autoclave en el modo habitual, inicie el proceso de tratamiento.
 - D) Deberán registrarse los siguientes datos: nombre de la persona que realiza la prueba, fecha, parámetros operativos, detallando hora de comienzo y finalización, descripción general de los residuos y peso de la bolsa.
 - E) Al final del proceso de tratamiento, cuando retire la carga del autoclave, separe las tres bolsas que contienen los portadores.
 - F) Retire los SCBI de los portadores y realice las observaciones correspondientes a fin de determinar si los SCBI han sufrido algún daño.
 - G) Una vez registradas las observaciones, incube los tres SCBI y el control según las instrucciones proporcionadas por el fabricante del SCBI (usualmente 24 horas a 55-60 °C). La incubadora deberá poder mantener la temperatura dentro de los ± 2 °C durante el período de incubación.
 - H) Luego de la incubación, observe las cápsulas o recipientes del SCBI para determinar si hubo crecimiento o no, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Luego debe registrar los resultados de la prueba (ver planilla de muestra en el Apéndice B)

Frecuencia

Con excepción del ensayo de validación inicial realizado sobre un autoclave nuevo, la frecuencia normal para realizar la prueba de provocación microbiológica es una vez por semana.

Si la totalidad de los indicadores de la prueba demuestran la ausencia de crecimiento en cuatro pruebas consecutivas (un mes), puede reducirse la frecuencia de las mismas a una vez cada quince días.

Fallas

Los SCBI que presenten algún tipo de daño que pueda llegar a afectar la determinación de inactivación microbiana (recipientes con fisuras y exposición de las tiras de esporas, filtraciones de las cápsulas de vidrio que contienen el medio de cultivo, tapas con roturas) deberán mencionarse en el informe pero no serán incluidos en la determinación. Para que una prueba sea válida, los tres SCBI empleados deberán resultar totalmente indemnes. De lo contrario, deberá repetirse la prueba.

Se considerará que el proceso ha sido exitoso cuando todos los SCBI demuestren ausencia de crecimiento. Si uno o más SCBI señala la presencia de crecimiento, deberá identificarse el problema para

determinar el origen del mismo, el que puede ser, por ejemplo, la necesidad de realizar tareas de mantenimiento en el equipo o de ajustar los parámetros operativos (aumentar el tiempo de exposición, la temperatura, o la cantidad o profundidad de los ciclos de vacío en caso de tratarse de un autoclave por vacío). La prueba deberá repetirse en cada pasada hasta que ningún SCBI demuestre crecimiento. Se deberá continuar con las pruebas hasta que haya tres pruebas consecutivas que demuestren la ausencia de crecimiento en la totalidad de los SCBI. En adelante, se realizarán en forma semanal hasta que cuatro pruebas consecutivas demuestren la ausencia de crecimiento y a partir de entonces, podrá reducirse la frecuencia a una vez cada quince días.

Registros

Los registros de los resultados de las pruebas de provocación microbiológica deberán ponerse a disposición de las autoridades regulatorias cuando éstas los soliciten o presentarse ante ellas de manera periódica, de conformidad con la normativa vigente. El establecimiento deberá conservar los registros durante un mínimo de tres años.

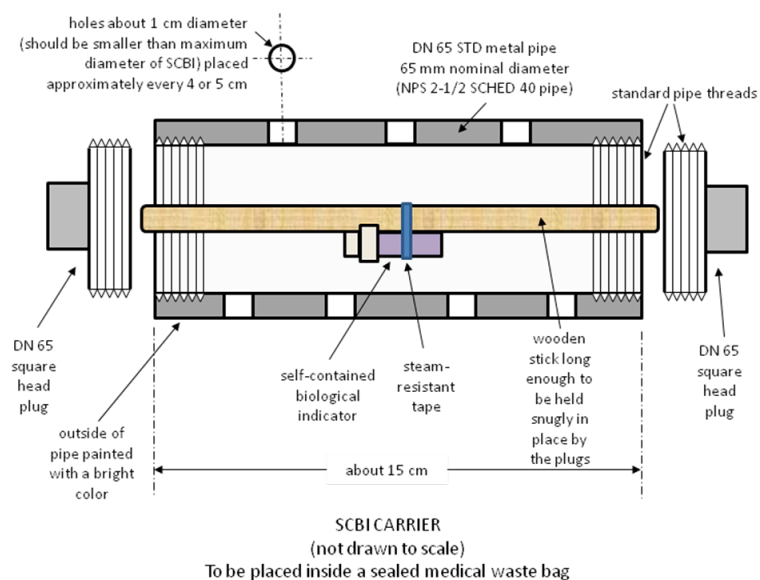
MODIFICACIONES PARA OTROS SISTEMAS DE TRATAMIENTO

El presente protocolo puede modificarse para adaptarse a unidades de microondas y sistemas híbridos por vapor que incluyan trituración o mezclado internos en los que las bolsas se rompan y liberen su contenido dentro de la cámara del autoclave o unidad de microondas.

Para evitar que los trituradores internos destruyan los SCBI, éstos deberán introducirse dentro de la unidad por medio de un salvoconducto de modo tal de evitar pasar por la sección de trituración. En el caso de unidades equipadas con brazos o paletas mezcladoras o autoclaves rotatorios, el diseño del portador deberá respetar las siguientes características:

- Tamaño relativamente pequeño
- Fácil de abrir y de sujetar
- Suficientemente resistente para proteger el SCBI y para ser utilizado varias veces
- Diseñado para permitir que el vapor penetre con facilidad
- Fácilmente visible (por ejemplo, pintados con colores vivos) para su recuperación

Algunos ejemplos de portadores de diseño simple son los realizados con una pelota de tenis con una serie de perforaciones, un tubo de Teflon[®] con orificios y tapones de madera sujetos en ambos extremos con alambre grueso, y tuberías de metal cortas con orificios y tapas roscadas en ambos extremos como se muestra en el siguiente gráfico. Los residuos triturados deben colocarse dentro del portador junto con el SCBI.



Jorge Emmanuel, PhD y Ed Krisiunas, MT (ASCP), MPH
16 de noviembre de 2010

Este documento fue desarrollado por el Proyecto del PNUD FMAM sobre gestión de los desechos generados por la atención de la salud y puede ser utilizado como recurso para mejorar la gestión de esta clase de desecho. El mismo está protegido por derechos de autor, sin embargo puede reproducirse en su formato original, sin realizar sobre él ningún tipo de modificación, sin mediar permiso previo, para todo aquello que esté relacionado con tareas de representación y apoyo, campañas y educación. Queda terminantemente prohibida su reproducción y distribución con fines comerciales. En caso de que se hicieran más de cinco copias para distribución, se deberá notificar al PNUD/FMAM por correo electrónico a <http://www.gefmedwaste.org/contactus.php>. En caso de citarse párrafos o pasajes cortos, se deberá hacer la debida referencia bibliográfica de la fuente. El PNUD FMAM no garantiza que la información aquí contenida sea completa ni correcta, ni será responsable por los posibles daños que surgieran por su uso.

APÉNDICE A

Ejemplos de insumos para realizar los ensayos

Aclaración 1: La mención de los productos detallados a continuación no representa ningún tipo de aval ni recomendación por parte del proyecto PNUD/FMAM. Los mismos se presentan sólo a modo de ejemplo. Existen otros productos que cumplen con los requisitos detallados en este documento orientador.

Aclaración 2: Los siguientes ejemplos utilizan concentraciones de esporas bacterianas de $1,0 \times 10^5$. Para los autoclaves utilizados para el tratamiento de residuos, la STAATT sólo requiere concentraciones de esporas bacterianas de $1,0 \times 10^4$. Si bien una concentración igual a 10^5 es un requisito más estricto, puede resultar más fácil de conseguir a nivel comercial.

Cápsulas ProSpore o Indicadores Biológicos Autocontenidos ProSpore 2 de Raven

Geobacillus stearothermophilus ATCC 7953, concentración mínima $1,0 \times 10^5$ ufc/ml
Incubadora de baño seco ProSpore o ProSpore 2, 12 cubas, 240 voltios, 35 ó 55 °C
Raven Labs, P.O. Box 27261, Omaha, NE 68127 EEUU; TEL: +1-402-593-0781
<http://www.mesalabs.com/products-services/raven-labs.html>

Indicadores Biológicos Autocontenidos Attest™ de 3M™

Geobacillus stearothermophilus (derivado de ATCC 7953) en un recipiente flexible de polipropileno, población mínima de 1×10^5 esporas por tira, incluye un medio de cultivo de caldo de tripticasa de soja con indicador de pH (púrpura de bromocresol)
Incubadora Attest, 220/240 voltios, capacidad para 14 recipientes, $56 \pm 2^\circ\text{C}$
3M Center, St. Paul, MN 55144 EEUU
http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/IP/infectionprevention/solutions/sterilization-assurance/load-control/

Indicadores Biológicos Autocontenidos de SporView®

Geobacillus stearothermophilus, población $2,2 \times 10^5$, resultados en 24 horas
Medical Engineering Technologies Ltd., Yew Tree Studios, Stone Street, Stanford North, Ashford, Kent TN25 6DH, Reino Unido; TEL: +44 (0)8454 588924
<http://www.met.uk.com/6a-medical-sterilisation-indicators.php#self-contained-biological>

Indicadores Biológicos Autocontenidos de Bionova Terragene

Esporas bacterianas de *geobacillus stearothermophilus* sobre papel filtro envasadas dentro de un tubo de plástico, y en su interior, una cápsula de vidrio precintada con un medio de cultivo y un indicador cromático.
MedNet GmbH, Borkstraße 10, 48163 Münster, Alemania; TEL: +49 (0) 251 32266-0
<http://www.medneteuropa.com/Sterilisation-Monitori.14.0.html?&L=2>

APÉNDICE B

Registro de ensayos realizados con indicadores biológicos

Prueba de provocación

Nombre: _____ Fecha de la prueba: _____

Dirección: _____

Marca del indicador biológico: _____ Concentración: _____

Número de producto/ Lote - _____ Fecha de vencimiento: _____

Número de modelo del autoclave: _____

Parámetros operativos del autoclave: _____

Hora de comienzo del ciclo: _____

Hora de finalización del ciclo: _____

Descripción de las bolsas con residuos seleccionadas para colocar los SCBI

Muestra N°	Peso (kg)	Descripción de los residuos	Ubicación en el autoclave
N° 1			
N° 2			
N° 3			

Resultados de la prueba

Control negativo	
Muestra N°	Resultados
N° 1	
N° 2	
N° 3	
Control positivo	

El control negativo es un indicador biológico no procesado
Los resultados deben registrarse como “+” ante la presencia de crecimiento (falla)
Y como “AC” en caso de ausencia de crecimiento

Comentarios/ condiciones alteradas durante la prueba, en caso de que hubiera:

