

Estudio del proceso de descontaminación de desechos de laboratorio de microbiología en bolsas de polipropileno por esterilización en autoclave a vapor saturado

Giannavola, C.; Svensen, A.; Alarcón, C.; González, V.

INTI-Carnes

Introducción

Un principio básico de la bioseguridad indica que todo material contaminado debe ser descontaminado previo a su disposición final. La descontaminación comprende la esterilización (completa destrucción de todos los microorganismos, incluyendo esporas bacterianas) y la desinfección (eliminación de microorganismos, pero no necesariamente esporas).

Las autoclaves a vapor saturado son habitualmente utilizadas por laboratorios de microbiología para descontaminar desechos biológicos por esterilización. Es usual la colocación del material a descontaminar en bolsas plásticas, las cuales son ubicadas en la autoclave para su posterior tratamiento.

En la bibliografía ^{[1][2][3]} se presentan procesos o ciclos de esterilización (condiciones tiempo/temperatura) recomendados a modo de guía (p.e. 30 minutos a 121 °C), los cuales suelen ser adoptados por los laboratorios sin previa validación de su eficacia en función de las características de la carga. Se utilizan periódicamente indicadores biológicos (p.e. esporas de *B. stearothermophilus*) para el control de esterilidad, los cuales no siempre es posible colocarlos dentro de las bolsas, en su punto de calentamiento más lento. Este requisito es indispensable para asegurar la adecuada destrucción microbiana en toda la carga. Debido a las distintas características del material a descontaminar (placas de Petri, bolsas de stomacher, etc.) y de la bolsa que lo contiene (material, espesor, tamaño, simple o doble bolsa, etc), es de esperar una marcada variabilidad en los perfiles de temperatura en el interior del material durante el proceso térmico en la autoclave; la temperatura en dicho punto aumentará con mayor o menor velocidad, variando así la eficacia del proceso aplicado. Reglamentaciones actuales ^{[4][5]} hacen un mayor hincapié en la determinación de

ciclos de esterilización adecuados a las características particulares de la carga a descontaminar, en base a ensayos de penetración de calor. Se prevé que los factores citados en relación al material a descontaminar y su envase, así como también la forma de carga de la autoclave, puedan provocar una prolongación del tiempo de proceso a una dada temperatura de la autoclave.

Si bien en la bibliografía ^{[6][7][8]} se hallan trabajos en los cuales se ajustaron (prolongaron) los tiempos de esterilización usados para descontaminar desechos de laboratorio de características definidas en base a estudios de penetración de calor, los mismos se hicieron calculando tiempos desde que el centro del material a descontaminar alcanzaba la temperatura deseada (usualmente 121 °C). Este modo de trabajo requiere repetir ensayos para cada temperatura de esterilización propuesta, no permitiendo ningún tipo de extrapolación. El Centro INTI-Carnes se ha especializado en procesos térmicos aplicados a la industria alimentaria y realiza habitualmente estudios de penetración de calor en productos envasados (ej. latas de conserva) con el objeto de validar procesos de esterilización actuales o bien para su diseño. En esta industria está ampliamente difundido el concepto de Valor de Letalidad o valor Fo, que permite comparar la eficacia de distintos ciclos de esterilización a través de esquemas de cálculo definidos.

El objetivo del trabajo fue aplicar los conceptos y programas de cálculo ^[9] que constituyen la base de los estudios que el Centro realiza habitualmente a nivel industrial, para establecer ciclos de esterilización eficaces de acuerdo a un dado criterio de inactivación microbiana, para la descontaminación de una carga típica de material de desecho de un laboratorio de microbiología de alimentos contenido en bolsas de polipropileno, en

una autoclave a vapor saturado tipo Chamberland.

Los ensayos de penetración de calor se realizaron en bolsas cargadas con placas de Petri, las cuales constituyen el material de desecho del laboratorio de microbiología del Centro que ofrece la mayor resistencia a la transferencia de calor (caso más desfavorable).

Metodología

Se colocaron termocuplas de cobre-constantán – tipo T- (Ellab A/S, Dinamarca) en el interior de bolsas de polipropileno de 30 cm x 60 cm, 80 micrones (2MS, BDVH 30 x 60) cargadas en forma completa con placas de Petri descartables sembradas (43-70 placas de Petri por bolsa, promedio: 59). El peso de las bolsas se encontró en el rango 1,40 – 2,45 kg (promedio: 1,90 kg). Dimensiones de las bolsas cargadas: 15 cm x 23 cm x 34 cm. La junta de medición de la termocupla se ubicó sobre el eje longitudinal, entre las placas de Petri, a 17 cm del fondo (punto de calentamiento más desfavorable debido a la compactación de la carga sufrida durante el proceso de esterilización). Adoptando el criterio de G. Ozanne y colaboradores [6], cada bolsa se procesó cerrada (se ató con hilo) y sin adición de agua.

En cada ensayo se cargaron tres bolsas con las termocuplas en una autoclave de laboratorio tipo Chamberland (VZ modelo 75L, Villar y Zaurdo SRL, Argentina), calefaccionada a gas natural, de 75 dm³ de capacidad (diámetro: 40 cm; altura: 60 cm), con control manual. Este es el máximo número de bolsas permitido por las dimensiones de la autoclave, quedando las mismas en contacto lateral. Se colocó una termocupla en la cámara (ambiente) para el seguimiento de la temperatura de proceso. Las termocuplas se conectaron a un sistema de adquisición de datos (HYDRA 2625A, Fluke, USA) para el registro y almacenamiento de los valores de temperatura.

Las termocuplas utilizadas fueron previamente calibradas siguiendo procedimientos que aseguran la trazabilidad a patrones nacionales.

Una vez cerrada la autoclave, se encendió el equipo, dando comienzo el ensayo. El tiempo de venteo (eliminación del aire de la cámara) se ubicó en el rango 40 - 59 minutos. El tiempo de puesta en régimen (tiempo que el equipo tarda en alcanzar la temperatura de proceso) resultó entre 52 y 62 minutos. La temperatura de proceso fue de 121 °C en todos los ensayos. Esta temperatura se mantuvo durante un tiempo de 50 minutos. Se midieron las temperaturas desde el comienzo de la calefacción de la autoclave a intervalos de 4 minutos hasta su finalización.

Se ensayaron 15 bolsas en total.

Los registros de temperatura de las bolsas y del ambiente en función del tiempo se volcaron en los programas de cálculo [9] a fin de determinar los parámetros característicos de penetración de calor f_h (tiempo para reducir la diferencia entre la temperatura de proceso y la del punto en estudio en un 90 %) –indicativo de la velocidad de calentamiento- y j_h (factor de retardo de la curva de calentamiento).

Posteriormente, se determinó estadísticamente la muestra (bolsa) cuya velocidad de penetración de calor representó el caso más desfavorable. Para ello se estableció un límite de confianza teniendo en cuenta la variación en el parámetro f_h ; se tomó $P < 0,0025$ para la probabilidad de un valor mayor (corresponde a un nivel de confianza de 99,75 %). A partir del valor f_h calculado de esta forma ($f_{h,p}$), que equivale a una probabilidad de 1 en 400 de que alguna muestra posea un valor mayor, y del factor de retardo j_h promedio para la totalidad de las muestras, se calculó el tiempo del ciclo de esterilización necesario para alcanzar un valor F_0 prefijado de 15 minutos en el punto de calentamiento más lento de la carga. Este valor F_0 se corresponde con el criterio de mantener durante 15 minutos una temperatura de 121 °C en dicho punto, adoptado por otros autores [5][6] como adecuado para lograr una eficaz esterilización.

A través de los programas de cálculo se establecieron tiempos de esterilización para distintas temperaturas de posible interés.

Resultados

En la *Figura 1* se muestra una curva típica de calentamiento de las bolsas en una autoclave tipo Chamberland.

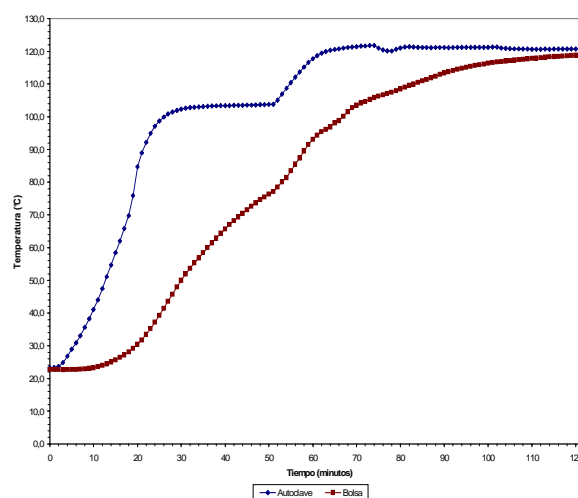


Figura 1: Calentamiento de una bolsa de polipropileno 30 cm x 60 cm con placas de Petri, procesada a 121 °C en una

autoclave tipo Chamberland.

En la Tabla I se han volcado los parámetros característicos de penetración de calor f_h y j_h calculados para las muestras ensayadas.

Tabla I. Parámetros característicos de penetración de calor.

Muestra N°	f_h (minutos)	j_h (minutos)
1	48,8	0,66
2	34,5	0,75
3	39,2	0,73
4	30,0	0,98
5	46,7	0,59
6	28,0	0,55
7	32,1	0,59
8	37,6	0,64
9	35,9	0,58
10	52,0	0,75
11	31,2	0,78
12	28,6	0,82
13	25,6	0,64
14	26,1	1,47
15	31,6	1,01

A partir de los valores f_h individuales se calculó el parámetro $f_{h,p}$, el cual resultó igual a 61,8 minutos.

El tiempo para el ciclo de esterilización a 121 °C necesario para alcanzar un valor F_0 de 15 minutos en el punto de calentamiento más lento de la carga resultó de 75 minutos.

Siguiendo el tradicional criterio establecido por C. O. Ball [10], en el procedimiento de cálculo utilizado para la determinación del tiempo del ciclo de esterilización se consideró que el último segmento del tiempo de puesta en régimen (promedio), cuya longitud es igual al 40 % de su duración total, se puede asumir como tiempo a temperatura de proceso.

En la Tabla II se muestran los tiempos de ciclos de esterilización calculados para otras temperaturas de proceso.

Tabla II. Ciclos de esterilización para descontaminación de bolsas de polipropileno 30 cm x 60 cm con placas de Petri en una autoclave tipo Chamberland.

Temperatura de proceso (°C)	Tiempo de proceso (minutos)
121	75
123	65
126	55
130	46

Conclusiones

A partir de conceptos y programas de cálculo habitualmente utilizados para el diseño y validación de procesos de esterilización de conservas alimenticias, se determinaron ciclos de esterilización para la descontaminación de desechos de laboratorios de microbiología en bolsas de polipropileno de características definidas, en autoclaves a vapor tipo Chamberland, con dadas condiciones operativas, en base al criterio de mantener durante 15 minutos una temperatura de 121 °C en el punto de calentamiento más lento de la bolsa que estadísticamente representa el caso más desfavorable de esa población.

Los ciclos de esterilización establecidos en el presente trabajo son válidos para las condiciones de carga y operativas ensayadas. La metodología presentada podrá aplicarse para la determinación de procesos de descontaminación con otras condiciones (simple/doble bolsa, tipo y forma de carga, autoclave, etc.).

A partir del uso de ciclos de esterilización calculados para las condiciones de trabajo específicas de cada laboratorio, se posibilitará bajar la frecuencia de los controles con indicadores biológicos empleados habitualmente en los procesos de descontaminación de desechos.

Agradecimientos

Marcela Álvarez (INTI-Cereales y Oleaginosas)

Referencias

- [1] A. D. Eaton, ed., L. S. Clesceri, ed., E. W. Rice, ed., A. E. Greenberg, ed. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", Part 9000 "Microbial Examination", APHA, 21st ed., 2005.
- [2] OMS. "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio", 3^a ed., Ginebra, 2005.
- [3] ISO 7218:1996/Amd 1:2001. "Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – General Rules for Microbiological Examinations".
- [4] Public Health Agency of Canada. "The Laboratory Biosafety Guidelines", 3rd ed., 2004.
- [5] Department of the Army. "The Biological Defense Safety Program, Technical Safety Requirements", CFR Title 32–National Defense, Chapter V, Part 627, 2006.
- [6] G. Ozanne, R. Huot, C. Montpetit. "Influence of Packaging and Processing Conditions on the Decontamination of Laboratory Biomedical Waste by Steam Sterilization", Applied and Environmental Microbiology 59, pp 4335-4337, 1993.

-
- [7] W. A. Rutala, M. M. Stiegel, F. A. Sarubbi, Jr. "Decontamination of Laboratory Microbiological Waste by Steam Sterilization", *Applied and Environmental Microbiology* 43, pp 1311-1316, 1982.
- [8] J. L. Lauer, D. R. Battles, D. Vesley. "Decontaminating Infectious Laboratory Waste by Autoclaving", *Applied and Environmental Microbiology* 44, pp 690-694, 1982.
- [9] A. I. Svensen, N. L. Rodríguez, E. A. Viviani. "Diseño del Proceso Térmico por Computadora", *NOTICITECA* N° 65, vol. 11, pp 73-79, 1981.
- [10] C. O. Ball y F. C. W. Olson. "Sterilization in Food Technology", Mc Graw-Hill Book Company, Inc., 1957.

Para mayor información contactarse con: Giannavola, Carolina
cgiannavola@inti.gov.ar