

Parámetros de resistencia: Aplicación de población nominal, KT, ST y valor-D

Luego de cada procedimiento de esterilización, es crucial verificar que el método elegido haya eliminado de manera efectiva todos los posibles microorganismos. Por esta razón, los procesos de esterilización deben ser monitoreados utilizando indicadores biológicos y químicos.

Los indicadores biológicos (IB) o tests de esporas, constituyen el método con más amplia aceptación para evaluar la efectividad de la esterilización debido a que representan el nivel más alto de desafío: los IB desafían directamente el proceso de esterilización mediante el uso de microorganismos altamente resistentes a condiciones adversas particulares. Es decir, la garantía de esterilidad se basa en la capacidad del proceso de inactivar esporas bacterianas específicas, las cuales se emplean debido a su mayor resistencia en comparación con otros



microorganismos típicos.

Sin embargo, ¿cómo se puede asegurar que el proceso logra matar las esporas contenidas en el IB? Existen algunos parámetros de calidad que ayudan a determinar si las condiciones de la esterilización se alcanzan con éxito.

El propósito de este material técnico es explicar los parámetros de calidad listados en el certificado de análisis (COA), puntualmente el valor-D, el tiempo de muerte (KT), el tiempo de supervivencia (ST) y el valor-Z, los cuales son específicos para cada lote de IB. Según la norma ISO 11138, los fabricantes deben proporcionar la información de estos parámetros para cada lote, dado que resultan fundamentales a la hora de comprender el comportamiento y la resistencia de los IB.

Definiciones

Certificado de análisis (COA)

Quality certification		STEAM
Certificado de calidad		
Bionova® BT20		
Steam sterilization / Esterilización por Vapor		
Geobacillus stearothermophilus ATCC® 7953		
LOT		
		
Population / Población	CFU / UFC	
D - value / Valor D (121 °C)	min.	
Survival time / Tiempo de sobrevivencia	min.	
Survival time = (log ₁₀ labeled population - 2) x labeled D-value		
Kill time / Tiempo de muerte	min.	
Kill time = (log ₁₀ labeled population + 4) x labeled D-value		
D - value / Valor D (132 °C)	sec./seg.	
Survival time / Tiempo de sobrevivencia	min.	
Survival time = (log ₁₀ labeled population - 2) x labeled D-value		
Kill time / Tiempo de muerte	min.	
Kill time = (log ₁₀ labeled population + 4) x labeled D-value		
D - value / Valor D (135 °C)	sec./seg.	
Survival time / Tiempo de sobrevivencia	sec./seg.	
Survival time = (log ₁₀ labeled population - 2) x labeled D-value		
Kill time / Tiempo de muerte	min.	
Kill time = (log ₁₀ labeled population + 4) x labeled D-value		
Z-value / Valor Z	°C	
Parameters determined at time of manufacture according to ISO 11138-1: 2017, ISO 11138-3: 2017 and IRAM 37102: 1999 (Parts 1 and 3) standards. The values shown are reproducible only under the same conditions under which they were determined.		
Parámetros determinados al momento de la fabricación según normas ISO 11138-1: 2017, ISO 11138-3: 2017 e IRAM 37102: 1999 (Partes 1 y 3). Los valores presentados son reproducibles solo bajo las mismas condiciones en las cuales fueron determinados.		
ISO and USP Compliant Terragene® and Bionova® are registered trademarks of Terragene S.A. ATCC® is a registered trademark of American Type Culture Collection.		
		
Lic. Adrian J. Rovetto Director Técnico Technical Director		

El certificado de análisis (COA) es un documento que proporciona información detallada sobre la

calidad y seguridad de un producto. Este documento se confecciona de manera específica para cada lote y brinda los valores de aquellos parámetros clave para que el producto cumpla con los criterios requeridos por los organismos reguladores.

Por lo tanto, cada lote de IB cuenta con un COA que incluye una evaluación de los parámetros clave (valor-D, KT, ST) a tres temperaturas diferentes, los que a su vez pueden utilizarse para determinar el valor-Z. El COA también proporciona información adicional, tal como los ciclos recomendados y las condiciones de almacenamiento y transporte.

Para poder abordar la aplicación de estos parámetros, primero resulta fundamental definirlos:

Población

La población nominal se refiere a la cantidad de microorganismos viables contenidos en el IB, la cual debe ser informada en el COA por el fabricante. Este valor se expresa en unidades formadoras de colonias (UFC), que representan colonias visibles originadas a partir de una o varias células microbianas con capacidad de reproducción. La población se considera un parámetro de resistencia ya que es fundamental para el cálculo del valor-D, así como para la determinación del KT y del ST.

Cuando el usuario necesita verificar por sí mismo la población viable de esporas, la norma ISO

11138-1 establece que el resultado debe encontrarse dentro de un rango del 50% al 300% con respecto a la población nominal declarada por el fabricante para ser considerado aceptable. Según lo dispuesto por dicha norma, si el usuario lo solicita, el fabricante debe compartir el protocolo interno para determinar la población de esporas, el cual debe ser seguido estrictamente.

Terragene cuenta con su propio procedimiento detallado en la Nota Técnica #04: Protocolo de recuento de esporas. Este protocolo se desarrolló conforme a lo establecido en el Anexo A de la norma ISO 11138-1, lo que garantiza confiabilidad y cumplimiento de los requisitos normativos. El documento incluye las especificaciones del medio de cultivo a utilizar, así como los pasos necesarios para permitir una verificación precisa y estandarizada de la población por parte del usuario final.

Valor-D

El valor-D representa el tiempo -en el caso de radiación gamma, la dosis- que se necesita para reducir la población de microorganismos en un 90%, es decir, una reducción de 1 logaritmo. Por ejemplo, un IB que tiene una población inicial de 1×10^6 (1 000 000) esporas con un valor-D de 2.2 minutos, significa que tomaría 2.2 minutos reducir la población de esporas a 100 000 en las condiciones especificadas. El valor-D es un parámetro crucial para verificar que el proceso de esterilización logre el nivel deseado de reducción microbiana.

En los Anexos C y D de la norma ISO 11138, se listan una serie de métodos para calcular el valor-D. Entre ellos, Terragene utiliza el método limitado de Holcomb-Spearman-Karber (LHSPK). Este método tiene la ventaja de emplear una variable de tiempo que aumenta en intervalos iguales para cada prueba.

Tiempo de muerte

El tiempo de muerte (KT, por sus siglas en inglés) es el tiempo mínimo necesario para reducir la población de microorganismos a un nivel aceptable bajo determinadas condiciones. El KT es una medida de la resistencia del microorganismo: luego de dicho tiempo, la población se reducirá significativamente.

La fórmula para calcular KT es:

$$KT = (\log_{10} \text{población} + 4) \times (\text{valor-D})$$

El término "+4" en la ecuación agrega cuatro reducciones logarítmicas más allá del nivel necesario para reducir la población de esporas a un umbral aceptable. Esto asegura que todas las esporas se eliminen de manera efectiva durante el proceso de esterilización.

Tiempo de supervivencia (ST)

El tiempo de supervivencia (ST, por sus siglas en inglés) es el período de tiempo máximo durante el cual la mayoría de los microorganismos aún permanecen vivos. Este parámetro ayuda a estimar el tiempo máximo de exposición que no resulte en muerte de microorganismos, es decir, que la población todavía se mantenga viable durante todo el ciclo de esterilización.

Se puede calcular el ST usando el valor-D:

$$ST = (\log_{10} \text{población} - 2) \times (\text{valor-D})$$

El término "-2" tiene en cuenta las reducciones logarítmicas iniciales necesarias antes de llegar a un nivel donde solo quedan 100 esporas viables. El ST es útil para determinar el tiempo máximo requerido en el ciclo de esterilización antes de que las esporas comiencen a morir.

Valor-Z

El valor-Z se define como el cambio en la temperatura de exposición que corresponde a un cambio de orden decimal en el valor-D. En otras palabras, el valor-Z nos da una idea de cuán sensible es el IB a distintas temperaturas: si se comparan dos lotes de IB con distinto valor-Z, el lote con el menor valor-Z será más sensible a los cambios de temperatura que el otro.

A continuación se detallan los valores mínimos establecidos por norma:

ISO 11138	ISO 11138-2 OE	ISO 11138-3 VAPOR	ISO 11138-4 CALOR SECO	ISO 11138-5 FORM
Población (UFC/vial)	$\geq 1.0 \times 10^6$	$\geq 1.0 \times 10^5$	$\geq 1.0 \times 10^6$	$\geq 1.0 \times 10^5$
Valor-D (min)	mix OE $D_{54} \geq 2.5$ 100% OE $D_{54} \geq 2$	$D_{121} \geq 1.5$	$D_{160} \geq 2$	$D_{60} \geq 6$
Valor-Z (°C)	NA	$Z \geq 6$ (110 °C-138 °C)	$Z \geq 20$ (150 °C-180 °C)	NA
KT (min)*	mix OE $KT_{54} \leq 25$ 100% OE $KT_{54} \leq 20$	$KT_{121} \leq 13.5$	$KT_{160} \leq 20$	$KT_{60} \leq 54$
ST (min)*	mix OE $ST_{54} \geq 10$ 100% OE $ST_{54} \geq 10$	$ST_{121} \geq 4.5$	$ST_{160} \geq 8$	$ST_{60} \geq 18$

*Los valores KT y ST tomando la **población** y los **valores-D mínimos**.

La importancia del valor-D

Conocer la resistencia del IB nos permite seleccionar el lote más adecuado para aquellos ciclos menos exigentes que los estándares.

Si es necesario realizar el control de rutina de ciclos muy exigentes, se recomienda usar un IB con resistencia cercana al valor mínimo establecido por la norma. En cambio, si el objetivo es evaluar la letalidad de procesos más robustos o de mayor intensidad, entonces se recomienda optar por lotes con valor-D más alto.

Es importante señalar que estos parámetros se determinan con la utilización de equipos especializados, tales como resistómetros o sistemas de laboratorio. Los esterilizadores convencionales, a diferencia de dichos equipos, presentan diversas etapas en un ciclo estándar de esterilización que aportan a la letalidad del proceso, lo que hace que los parámetros de resistencia sean incluso más conservadores.

La importancia del valor-Z

Tanto en la industria farmacéutica como en la alimentaria, se suelen esterilizar materiales a temperaturas no convencionales, es decir, diferentes de 121, 132 y 135°C. El valor-Z puede ser muy útil cuando se necesita saber cómo se comportaría un IB al exponerse a una temperatura no reportada en el COA.

Desde una perspectiva gráfica, el valor-Z es el recíproco negativo de la pendiente de la línea

entre dos puntos en el gráfico semi-logarítmico de valor-D vs. temperatura. Por lo tanto, utilizando el valor-Z proporcionado, la temperatura con la que deseamos trabajar y un valor-D (dado a una temperatura diferente), se puede recalcular el valor-D para un ciclo en particular.

Por ejemplo, si se quiere saber el Valor-D de un IB a una segunda temperatura (T2), se calcula con la siguiente ecuación:

$$\log D_2 = \log D_1 - \frac{(T_2 - T_1)}{Z}$$

Donde:

D1: es el valor-D a T1 (informado en el COA)
D2: is the D-value at T2 (the working temperature)
T1: es la temperatura de referencia (informada en el COA)
T2: es la temperatura de trabajo
z: es el valor-Z (informado en el COA).

Reorganizando la ecuación:

$$D_2 = 10^{\left(- \frac{(T_2 - T_1)}{Z} + \log D_1 \right)}$$

Es importante tener en cuenta que primero es necesario validar con el fabricante del IB el rango de linealidad para el cual se puede aplicar esta ecuación.

Conclusiones

La correcta interpretación y aplicación de los parámetros de resistencia de un IB son esenciales para optimizar los ciclos de esterilización y garantizar la confiabilidad del producto. Conocer el IB es tan importante como conocer el proceso de esterilización y el material a procesar para asegurar un ciclo seguro y eficaz.

References

1. Organización Internacional de Normalización. (2017). *Esterilización de productos sanitarios — Indicadores biológicos — Parte 1: Requisitos generales (ISO 11138-1:2017)*. ISO.
2. Organización Internacional de Normalización. (2017). *Esterilización de productos sanitarios — Indicadores biológicos — Parte 2: Indicadores biológicos para procesos de esterilización con óxido de etileno (ISO 11138-2:2017)*. ISO.
3. Organización Internacional de Normalización. (2017). *Esterilización de productos sanitarios — Indicadores biológicos — Parte 3: Indicadores biológicos para procesos de esterilización por calor húmedo (ISO 11138-3:2017)*. ISO.
4. Organización Internacional de Normalización. (2017). *Esterilización de productos sanitarios — Indicadores biológicos — Parte 4: Indicadores biológicos para procesos de esterilización por calor seco (ISO 11138-4:2017)*. ISO.
5. Organización Internacional de Normalización. (2017). *Esterilización de productos sanitarios — Indicadores biológicos — Parte 5: Indicadores biológicos para procesos de esterilización con vapor a baja temperatura y formaldehído (ISO 11138-5:2017)*. ISO.
6. Farmacopea de los Estados Unidos. (2023). Indicadores biológicos: Pruebas de rendimiento de resistencia (USP <55>). En *USP-NF. Primer suplemento de la Farmacopea de los Estados Unidos 46 - Formulario Nacional 41*, Pruebas microbiológicas. Convención Farmacopeica de los Estados Unidos.