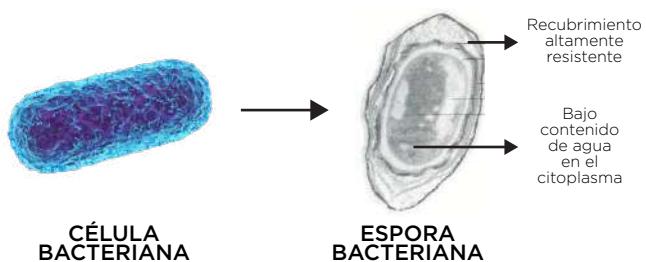




Estudio de Tiempo de Incubación Reducida (RIT)

terragene.com

El uso de indicadores biológicos para monitoreo de procesos de esterilización permite evaluar el potencial del esterilizador para garantizar la aniquilación del microorganismo más resistente al proceso. Ciertas bacterias tienen la capacidad de cambiar su estructura para adaptarse a condiciones desfavorables. Al proceso durante el cual la bacteria modifica su estructura y se convierte en una estructura más resistente se llama esporulación. Durante la esporulación la célula bacteriana sufre distintos cambios morfológicos. El citoplasma de la célula pierde gran cantidad de agua haciendo esta nueva estructura muy resistente a procesos térmicos. Recordemos que el agua es un excelente medio para la conducción del calor. Durante la esporulación una corteza altamente resistente a la penetración de agentes químicos se crea como capa protectora de la célula. Además, el ADN de la célula se compacta y queda protegido por una capa proteica, lo que hace a la estructura más resistente a la acción de agentes radiactivos. La base del funcionamiento de los indicadores biológicos para evaluar los procesos de esterilización se basa precisamente en la presencia de estas esporas.



Después de que las esporas son sometidas al proceso de esterilización, solo se requiere un medio con los nutrientes necesarios para su desarrollo y una condición de temperatura óptima para revelar el resultado. Si las esporas sobreviven al proceso de esterilización, cuando se ponen en contacto con el medio con los nutrientes a la temperatura necesaria, se reactiva su metabolismo. Cuando los nutrientes se incorporan en placas con agar, es posible realizar el cultivo e identificar el crecimiento durante un período de 7 días mediante inspección visual.

El procedimiento de cultivo en placa tiene los inconvenientes de que se debe realizar en condiciones controladas, para evitar la contaminación cruzada de la placa y la aparición de resultados falsos positivos (crecimiento por contaminación y no por supervivencia del microorganismo al proceso de esterilización).

Con el fin de facilitar el revelado de los indicadores biológicos, surgieron los llamados indicadores biológicos autocontenidos. En esta presentación la espora y el medio de cultivo se encuentran en

una misma presentación evitando así las posibles contaminaciones por manipulación. Además con la idea de acelerar los tiempos de incubación, se utilizan medios de cultivo específicos con indicador de pH. La incorporación de un indicador de pH en el medio permite identificar de forma temprana el crecimiento de la espora. Durante el metabolismo las esporas suelen generar subproductos que acidifican su entorno. La acidificación del medio es captada por el indicador de pH generando como respuesta un cambio drástico de color del medio en un tiempo mucho más rápido (24, 48, 72h) que el necesario para revelar el resultado en una placa de cultivo.

Con el fin de acelerar el resultado y poder tomar acciones más rápidas, una nueva tecnología fue adoptada en la línea de los indicadores biológicos: la lectura por fluorescencia. Para anticipar el resultado que puede generar la evaluación de la acidez del medio del cultivo, ciertos componentes de la espora fueron estudiados. Cierta enzima de la espora tiene la posibilidad de reaccionar con un compuesto incorporado en el medio de cultivo generando como resultado un sub-producto fluorescente. Con la ayuda de un sistema óptico (excitador/receptor) se puede detectar la señal de fluorescencia que genera este sub-producto de la reacción en tiempos muy rápidos. De esta forma los tiempos de respuesta al resultado de un indicador biológico han sido reducidos a valores desde 4 horas, 1 hora, 20 min y hasta 5 minutos.

Aún así en el caso de urgencias, evaluar la letalidad de un proceso seguía siendo un desafío. Terragene ha diseñado un sistema indicador biológico que parte de los principios básicos de la esterilización con vapor: desnaturización de proteínas. Un nuevo indicador biológico para monitoreo de procesos de esterilización con vapor y tiempo de incubación en solo 7 segundos se ha convertido en una herramienta segura y potente. Para lograr un resultado instantáneo, un sensor estructural de proteína ha sido incorporado en el medio de cultivo del indicador. Si la proteína no está totalmente desnaturizada después del proceso, el sensor se podrá acoplar a ciertos grupos de la misma y este acople generará una señal de fluorescencia que se podrá captar con un sistema óptico especializado de forma instantánea. Esta señal muestra que el proceso de esterilización falla en inactivar la población de microorganismos, ya que le resulta imposible desnaturizar la proteína asociada a la espora.

Cualquiera de las lecturas que se anticipan al crecimiento del microorganismo en placas de cultivo durante 7 días es considerada un resultado rápido del indicador y debe ser validado mediante un estudio conocido como Estudio de Tiempo de Incubación Reducida (RIT).

La Guía de Indicadores Biológicos de FDA fue el primer documento oficial que estandariza cómo realizar este estudio. En 2021, ISO 11138, aprueba una parte 8 relacionada a este estudio específicamente para indicadores diseñados para monitorear procesos de esterilización con vapor y óxido de etileno.

En resumen, ambos documentos coinciden en un ensayo de identificación de ciclos parciales donde cierto porcentaje de la cantidad de indicadores expuestos sobrevivan a las condiciones ensayadas. Tres lotes distintos y un mínimo de 100 indicadores biológicos por lote deben ser sometidos a estos ciclos fraccionales. Los indicadores deben ser revelados y estudiados

Los ensayos planteados en la guía de indicadores biológicos de FDA e ISO11138-8 difieren en ciertos puntos que se detallan en la tabla a continuación:

	Guías de BI de FDA	ISO 11138-8
Alcance	Todos los BIs con un tiempo de incubación menor a 7 días	BIs de vapor y EO con un tiempo de incubación menor a 7 días
Ciclo fraccionado	Se espera que el 30-80% de los BIs expuestos sean positivos después de 7 días de incubación	Se espera que el 30-95% de los BIs expuestos sean positivos después de 7 días de incubación
Condiciones para el ciclo fraccionado	Un ciclo parcial es aquel en el que se cumplen todos los parámetros de esterilización, excepto el parámetro de tiempo	Se pueden modificar otras variables del proceso (por ejemplo, tiempo, temperatura o concentración) para lograr la respuesta fraccionada
Holding time	No más de 8 horas	Debería estar documentado

El protocolo que sigue Terragene para la validación de cualquier tiempo de lectura diferente a 7 días de sus indicadores biológicos tiene en cuenta las recomendaciones establecidas en la guía de indicadores biológicos de FDA, ya que el dicho documento es más abarcativo y contempla los rangos de trabajo definidos en la norma ISO11138-8. Por tanto, nuestros indicadores

durante la incubación por 7 días. La sensibilidad de la lectura rápida debe ser mayor o igual a un 97% y determinada como:

$$Nx / Ny * 100 \geq 97\%$$

Donde:

Nx es el número de BI positivos en el intervalo de tiempo **x** para el ciclo fraccionario individual para cada lote (**x** es el tiempo de incubación reducido a validar)

Ny es el número de BI positivos a los 7 días de incubación para el ciclo de fracción individual de cada lote.

biológicos para monitorear procesos de vapor y óxido de etileno tienen un tiempo de incubación reducida que cumple con las recomendaciones de la norma ISO11138-8 y de la guía de indicadores biológicos de FDA. Mientras que el resto de los indicadores para los demás procesos tienen una lectura rápida validada según la guía de indicadores biológicos de FDA.

Referencias

- Guidance for Industry and FDA Staff Biological Indicator (BI) Premarket Notification [510(k)] Submissions, Octubre 4, 2007

- ISO 11138-8:2021. Sterilization of health care products - Biological indicators - Part 8: Method for validation of a reduced incubation time for a biological indicator, Julio 2021