

# Recuento de esporas viables

Una breve comparación entre el protocolo de USP y el protocolo validado por Terragene

*Recomendamos consultar el protocolo validado por Terragene para realizar el recuento de esporas viables, descrito en la Nota Técnica: protocolo de recuento de esporas de Terragene. También se encuentra disponible el vídeo paso a paso en el canal de YouTube de Terragene.*

## Introducción

Los fabricantes de indicadores biológicos (IB) deben informar parámetros específicos de calidad del producto, entre los cuales se encuentra la población nominal de esporas. Para cada tipo de proceso de esterilización, las normas internacionales definen la población nominal mínima que debe contener un IB. Por lo tanto, el recuento viable de esporas es una técnica clave para evaluar la calidad de los IB: determina la cantidad de microorganismos viables inoculados en un lote de IB y, en algunos casos, permite respaldar la evaluación cuantitativa de la reducción microbiana lograda durante un proceso de esterilización.

Estándares internacionales como ISO 11138-1:2017 y la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) proporcionan directrices para el recuento de esporas. Los fabricantes pueden desarrollar y validar sus propios métodos basándose en estos lineamientos. Estos protocolos personalizados suelen incorporar consideraciones metodológicas adicionales adaptadas a las características de cada producto y a los desafíos asociados con el tipo de portador de esporas utilizado. Una vez validado, este protocolo se emplea para demostrar la conformidad del producto con la normativa aplicable y debe estar disponible para cualquier parte que desee verificar la población declarada en los certificados de calidad de cada lote de IB.

Las normas mencionadas difieren en varias recomendaciones relacionadas con las etapas de extracción, cultivo y conteo, así como en las precauciones que deben tenerse en cuenta durante todo el proceso.

Las recomendaciones de ISO 11138-1:2017 son de carácter general. Los fabricantes pueden elegir libremente los materiales y las técnicas utilizadas; sin embargo, el método seleccionado debe estar validado previamente y se deben evaluar al menos cuatro muestras por lote. ISO también recomienda preparar una serie de diluciones seriadas antes de sembrar las muestras en el medio de cultivo adecuado.

En cambio, el protocolo USP es más prescriptivo. Exige un mínimo de tres muestras de ensayo y brinda instrucciones paso a paso para la elución, la siembra y la enumeración de colonias. El

procedimiento también varía según el tipo de portador de esporas (portadores de papel, portadores de otros materiales o suspensiones). Aunque USP suele ser el protocolo de referencia en la mayoría de los laboratorios farmacéuticos, este sigue siendo general y no aborda por completo la variabilidad en materiales y procesos de acondicionamiento que caracterizan a las distintas marcas de IB disponibles en el mercado.

Ambos protocolos coinciden en que el rango más confiable para lograr una enumeración precisa es de 30 a 300 UFC.



## Comparación entre los protocolos de Terragene y USP

Terragene ha desarrollado y validado protocolos de recuento de esporas específicamente optimizados para cada tipo de IB que produce. Estos protocolos están diseñados en base a las recomendaciones y lineamientos establecidos en la norma ISO 11138-1:2017.

El sector farmacéutico es el que realiza recuentos viables con mayor frecuencia como parte de sus procedimientos internos de aseguramiento de la calidad, con el objetivo de verificar la población nominal declarada en los certificados de análisis de cada lote adquirido. Sin embargo, los resultados que obtienen a menudo no coinciden con lo esperado. La razón es simple: como se mencionó antes, estos ensayos suelen realizarse siguiendo el protocolo USP.

Los IB de Terragene están diseñados y validados conforme a las normas ISO, y cualquier usuario que desee realizar un recuento de esporas o verificar la población debe ajustarse al protocolo del fabricante. Estas normas establecen que la verificación de la población debe ubicarse entre el 50% y el 300% de la población declarada para ese lote, siempre y **cuando se siga estrictamente el protocolo de recuento del fabricante.**

Para comprender mejor las diferencias entre ambos protocolos, los puntos clave se analizan y resumen a continuación:

### **Número de muestras**

La USP recomienda utilizar **tres muestras para testear**, mientras que Terragene recomienda emplear un **mínimo de cuatro muestras** por lote/exposición, en línea con los lineamientos de la ISO. Aumentar la cantidad de muestras mejora la precisión del recuento, ya que permite obtener un promedio más confiable.

### **Elución**

Para la etapa de elución, la USP diferencia entre portadores de papel y portadores que no son de papel. Para portadores de papel, establece colocar los **tres portadores juntos** en un homogeneizador de 250 mL con 100 mL de agua purificada estéril, y mezclar hasta obtener una suspensión homogénea. Para portadores hechos con un material diferente al papel, la USP sugiere realizar sonicación o agitación en un agitador recíproco durante un tiempo adecuado. Para este paso, el procedimiento validado por Terragene no distingue entre portadores de papel y de otros materiales. La elución se realiza colocando **cada portador individualmente en un tubo de 2 mL** compatible con un homogeneizador, junto con **perlas de vidrio de 2-3 mm**. Cada tubo debe contener **600 µL de agua destilada desionizada y 400 µL de etanol**.

Eluir cada portador por separado ayuda a minimizar el error que podría generar un único proceso de separación. Las perlas favorecen el desprendimiento de esporas firmemente adheridas, lo que permite una recuperación más eficiente, especialmente en portadores metálicos. El vórtex, aunque más simple y rápido, depende únicamente de la turbulencia del líquido, lo que a menudo resulta en recuperaciones variables e incompletas. El uso de perlas de vidrio junto con el homogeneizador hace que el proceso de separación sea más eficaz, evitando la resistencia que ciertos materiales podrían generar durante una separación simple con homogeneizador.



Finalmente, la solución etanol:agua 40:60 en lugar de agua al 100% se utiliza ya que el etanol ayuda a disminuir levemente la polaridad del medio, facilitando la elución de las esporas desde los portadores.

### **Choque térmico**

Mientras que la USP recomienda dos rangos de temperatura y tiempo para realizar el choque térmico, entre 95-100 °C durante 15 minutos para termófilos y 80-85 °C durante 10 minutos para mesófilos, Terragene ha validado una recuperación de esporas altamente consistente tanto para *Geobacillus stearothermophilus* como para *Bacillus atrophaeus* utilizando una única temperatura de 85 °C: 15 minutos para *G. stearothermophilus* y 5 minutos para *B. atrophaeus*, *B. subtilis* y *B. pumilus*. Este enfoque estandarizado simplifica el trabajo en el laboratorio, debido a que la única variable a considerar es el tiempo.

### **Enfriamiento posterior al choque térmico**

Para enfriar las esporas luego del choque térmico, la USP recomienda utilizar un baño de hielo a 0-4 °C durante 5-10 minutos. Terragene, en cambio, ha validado el enfriamiento de las esporas a 0 °C durante 15 minutos. Estas condiciones son más controladas y reproducibles, ya que la temperatura fija de 0 °C elimina la variabilidad asociada a los rangos de refrigeración, mientras que el tiempo asegura una inactivación metabólica uniforme en toda la población de esporas. Es decir, este enfoque más estricto y estandarizado reduce la variabilidad entre laboratorios.

### **Dilución seriada**

Para realizar la dilución seriada, USP sugiere utilizar agua purificada. Terragene, por otro lado, recomienda utilizar agua desionizada. La naturaleza químicamente inerte del agua desionizada mantiene las esporas en suspensión sin entrar en contacto con sales o nutrientes que podrían activarlas o influir en su comportamiento.

### **Método de plaqueo**

En lo que respecta al método de plaqueo, la USP describe el método de vertido en placa, que consiste en verter agar fundido sobre el inóculo en una placa de Petri, dejando que la muestra se mezcle con el medio para luego solidificarse en conjunto. Terragene ha optado por el método de siembra en superficie, donde el inóculo se distribuye con una ansa estéril sobre la superficie de un medio previamente solidificado.

El método de siembra en superficie ofrece ciertas ventajas frente a la técnica de vertido en placa. Dado que *G. stearothermophilus* y las especies de *Bacillus* son organismos aerobios, la siembra en superficie garantiza que todas las colonias se desarrollen con exposición óptima al oxígeno. En el método de vertido en placa, las esporas pueden



quedar atrapadas dentro del agar y no germinar correctamente o formar colonias poco desarrolladas. Además, el método de siembra en superficie elimina el estrés térmico asociado al agar fundido, resultando en una morfología de colonias más clara y uniforme.

### **Medio de cultivo**

En cuanto a los medios de cultivo, ambos protocolos difieren notablemente en su nivel de especificidad. La USP recomienda utilizar Caldo Digerido de Caseína-Soja, el cual es un medio genérico. Terragene adquiere un enfoque más específico y define un medio de cultivo que ha sido validado para garantizar una recuperación óptima de esporas y un recuento preciso. El medio recomendado por Terragene es LBA suplementado con cloruro de calcio y glucosa, formulado para favorecer la germinación y promover un desarrollo robusto de las colonias. Su composición se detalla a continuación:

- Peptona de caseína ácida 1,0% p/v
- Extracto de levadura 0,5% p/v
- Cloruro de sodio 0,5% p/v
- Cloruro de calcio 0,05% p/v
- Glucosa 0,03% p/v
- Agar 1,5% p/v

### **Temperatura de incubación**

La USP indica llevar a cabo una incubación a 55–60 °C para los IB utilizados en esterilización por vapor, y a 30–35 °C para aquellos empleados en esterilización por óxido de etileno o calor seco. Basándose en su medio de cultivo optimizado y en distintas validaciones, Terragene establece condiciones de incubación más precisas:

*G. stearothermophilus*: incubar a  $(60 \pm 2)$  °C durante 48 horas.

*B. atrophaeus*, *B. subtilis* o *B. pumilus*: incubar a  $(37 \pm 2)$  °C durante 24 horas.

Estas condiciones garantizan una germinación óptima y un desarrollo de colonias consistente y confiable para cada especie.

## **Conclusión**

Si bien la USP ofrece un marco general para el recuento viable de esporas, su protocolo no contempla toda la diversidad de portadores, procesos de acondicionamiento y características de fabricación que distinguen a la amplia variedad de IB disponibles en el mercado. Los métodos validados por Terragene superan esta limitación al proporcionar un enfoque más preciso, específico para cada producto y metodológicamente sólido, optimizando todas las etapas del procedimiento: desde la elución y el choque térmico hasta el plaqueo, la incubación y la selección del medio de cultivo.

Los IB de Terragene están acondicionados para responder de manera eficiente a los distintos procesos de esterilización. Como resultado, el comportamiento de las esporas durante el recuento de viables puede diferir del esperado bajo protocolos validados por otros fabricantes. Por este motivo, cualquier usuario que desee realizar recuentos de esporas en indicadores de Terragene debe seguir estrictamente el protocolo validado por la empresa. Este método se basa en las recomendaciones de la norma ISO 11138-1:2017 y ha sido optimizado para ofrecer resultados precisos y consistentes dentro del margen de error requerido por la norma.

Al estandarizar variables críticas, el protocolo de Terragene garantiza una mayor exactitud y reproducibilidad en la verificación poblacional. Estas mejoras reducen la variabilidad entre laboratorios y minimizan el riesgo de subestimar la carga real de esporas.

## **Referencias**

- International Organization for Standardization. (2017). *ISO 11138-1:2017 Esterilización de productos para el cuidado de la salud—Indicadores biológicos—Parte 1: Requisitos generales*. ISO.
- Terragene. (s. f.). NT 04: *Determinación del recuento de microorganismos viables en indicadores biológicos*.
- United States Pharmacopeial Convention. (s. f.). USP <55> *Indicadores biológicos—Ensayos de desempeño de resistencia*. En *Farmacopea de los Estados Unidos—Formulario Nacional (USP-NF)* (USP 43-NF 38, Sexto Suplemento). USP.