



10 Evergreen Drive, Suite E,
Bozeman, MT 59715
Phone: (406) 585-9535
FAX: (406) 585-9219
www.sgmbiotech.com
sporenews@sgmbiotech.com
©SGM Biotech, Inc. 2009
ALL RIGHTS RESERVED
Produced in USA

SPORE NEWS

Volúmen 8, Número 3
Julio 2011

**Caramelización u oscurecimiento de los Indicadores Biológicos
para líquidos en ampollas sometidos a autoclave**

Traducido por:



Albareda, 6-8 entlo. Barcelona 08004
Tel.: +34 93 322 06 36
Fax: +34 93 441 65 90
Info@tiselab.com www.tiselab.com

Caramelización u oscurecimiento de los Indicadores Biológicos para líquidos en ampollas sometidos a autoclave

Russ Nyberg
Technical Support



Figura 1:
Ampollas con (derecha)
y sin crecimiento.

Cuando se autoclava agar líquido o caldo de triptona soja, los medios esterilizados muestran a menudo un color más oscuro que el esperado a causa de la esterilización y la consiguiente exposición al calor. Esto motiva cierta preocupación al trabajar con ampollas de vidrio sellado como las de los indicadores biológicos (BI) que contienen caldo de triptona soja (TSB). En la mayor parte de los indicadores biológicos autocontenidos envasados en ampollas, las esporas bacterianas se encuentran en forma de suspensión de esporas y TSB. Después de someter la ampolla de BI al autoclave durante la monitorización de un ciclo típico, se incuba para comprobar si todas las esporas han muerto o si alguna ha sobrevivido al ciclo. Esta prueba de crecimiento/no crecimiento se evalúa por el color y la transparencia del TSB en la ampolla. Las ampollas también contienen un indicador de pH que confiere un color púrpura al TSB.

Durante la incubación, si las esporas no murieron en el ciclo, germinarán para convertirse en células vegetativas, metabolizarán el TSB y comenzarán a crecer. Como consecuencia del metabolismo de los azúcares presentes en el TSB se liberan productos ácidos de desecho y el color de la ampolla cambia del púrpura al amarillo, como consecuencia de la disminución del pH. Al utilizar la ampolla autocontenida, se plantea la duda de si el normal oscurecimiento del color observado al exponer las ampollas a ciclos prolongados o de gran temperatura aún fomentará el crecimiento y detectará las esporas apenas dañadas que puedan haber sobrevivido al ciclo. Estas dudas obedecen principalmente a que algunas personas han afirmado que las ampollas de color más oscuro están *caramelizadas* y ya no funcionan por no ser capaces de fomentar el crecimiento.

Excepto los medios selectivos sensibles al calor, la mayoría de los demás deben esterilizarse, según las instrucciones del fabricante, a 121 °C durante 15 minutos. Estos parámetros de tiempo y temperatura para la esterilización están indicados muy claramente en la USP¹ al referirse a 'tiempo a la temperatura de los medios'. Así pues, 15 minutos a 121 °C significa que el medio se mantiene a 121 °C durante 15 minutos completos. Si consideramos que el matraz de medios tarda 20 minutos en alcanzar la temperatura, el ciclo completo deberá fijarse en 35 minutos: veinte minutos para alcanzar la temperatura y otros 15 minutos a 121 °C.

Es probable que los ciclos más prolongados o ampliados, además de los realizados a temperaturas superiores, más allá de la especificación de 15 minutos a 121 °C, causen un cierto grado de oscurecimiento natural o una caramelización de color pardo de los medios. Esto se debe simplemente a la exposición de los medios a ciclos ampliados o a mayor temperatura que las especificaciones del fabricante y por la presencia física de un indicador de pH de color púrpura.

¹USP 31, Pg. 3804, General Information, Media Preparation and Quality Control

Caramelización u oscurecimiento de los Indicadores Biológicos para líquidos en ampollas sometidos a autoclave

Durante la caramelización, la glucosa y otros azúcares que pueden estar presentes en los medios se oscurecen ligeramente, y el aspecto global de los medios se parece al de la miel oscura o presenta un color pardo claro. Además del propio oscurecimiento de los medios, la presencia adicional del indicador de pH, de color púrpura, utilizado en estas ampollas hace que el color parezca aún más oscuro que los medios sin el indicador de pH.

La caramelización es una preocupación importante para la mayoría de los usuarios de indicadores biológicos en ampollas de vidrio sellado, como ProSpore Ampoule o MagnaAmp. Es habitual que al utilizar estos indicadores biológicos en diversas situaciones, en las que las ampollas se exponen a ciclos ampliados o de mayor temperatura que 15 minutos a 121 °C, el color de los medios tienda a oscurecerse. Ambos tipos de BI tienen esporas bacterianas suspendidas en una ampolla de TSB que contiene azúcar. Las ampollas contienen también un indicador de pH de color púrpura para facilitar al usuario a determinar el crecimiento en la ampolla. Si el BI no murió en el ciclo de esterilización, las esporas supervivientes, durante la incubación, metabolizan los azúcares, liberan residuos ácidos y, cuando en consecuencia disminuye el pH, el indicador de pH hace variar el color de la ampolla de púrpura a amarillo.

Si, durante el proceso de autoclavado de estas ampollas se produce una ligera caramelización, debida a la presencia de azúcar junto a un indicador de pH de color púrpura, la ampolla tendrá un color más oscuro que el esperado y, desde luego, más oscuro que el de una ampolla no procesada. Esta es la razón por la que se debe utilizar una ampolla de control negativo como modelo visual del color de la ampolla procesada. La ampolla de control negativo se procesa junto a las ampollas de ensayo y puede ser utilizada como futura referencia del color de una ampolla normal 'procesada' cuando sea retirada del autoclave.

Con la incubación, la ampolla que muestre crecimiento cambiará aun más de color, hasta adquirir un color miel o amarillo, y presentará turbidez. Este cambio adicional de color puede apreciarse fácilmente al compararlo con el de una ampolla de control procesada. Puede presentarse un problema cuando una persona retira la ampolla del autoclave tras un ciclo y la coloca en una incubadora sin anotar o advertir que el color de la ampolla ya ha variado respecto a su color púrpura brillante inicial. Al cabo de 48 horas de incubación, otra persona, que desconoce el cambio normal de color de la ampolla procesada, retira la ampolla de la incubadora y atribuye el cambio de color de la ampolla retirada a la incubación y registra este cambio de color como una prueba positiva. Esta situación puede ser evitada guardando una ampolla procesada como guía del cambio normal de color y como ejemplo del color de crecimiento negativo en una ampolla de ensayo.

¿Compromete la caramelización la capacidad de los medios para fomentar el crecimiento?

El personal de Mesa Labs de la fábrica de Omaha² realizó en 2009 un estudio para determinar si el TSB caramelizado utilizado en una ampolla de BI sigue fomentando el crecimiento. Este estudio sometió al autoclave numerosas ampollas de ensayo y de control durante un ciclo de tiempo ampliado y a gran temperatura. Estas ampollas fueron sometidas al autoclave durante 2 horas a una temperatura de 132 °C. Al retirarlas, las ampollas tenían un color muy oscuro. Luego se estudió la capacidad de fomento del crecimiento de los medios esterilizados mediante la rotura aséptica de los capuchones de las ampollas y la inoculación de cada una de las ampollas con esporas de *Geobacillus stearothermophilus*. Se optó por esta espora bacteriana por ser la especie inicialmente presente en las ampollas de BI para el ensayo. Luego se incubaron todas las ampollas durante 48 horas a entre 55 y 60 °C. Las veinte ampollas esterilizadas inoculadas con esporas viables mostraron signos de crecimiento a las 48 horas de incubación, al variar el color de los medios hacia el amarillo. Así pues, el oscurecimiento o caramelización de los medios durante la exposición no compromete su capacidad de fomentar el crecimiento y ofrece datos útiles para el ensayo de esterilización.

²Robert Bradley, *ProSpore Media Integrity Study*, Nov. 2, 2009, www.MesaLabs.com, *Technical Papers*.

Caramelización u oscurecimiento de los Indicadores Biológicos para líquidos en ampollas sometidos a autoclave

Se debe advertir que una cierta caramelización en distintos tipos de medios puede no fomentar el crecimiento de otras especies bacterianas, distintas a las utilizadas en las ampollas de BI. Sería necesario realizar estudios adicionales con estos medios y/o estos organismos. Sin embargo, respecto al organismo indicador del BI, *Geobacillus stearothermophilus*, utilizado en las ampollas de esporas, el oscurecimiento y la caramelización de los medios no modificará la capacidad de fomento del crecimiento de los medios ni la función del BI.

¿Funcionará todavía el BI cuando los medios son tan oscuros?

Sí

¿Cómo puedo decir que una ampolla es positiva cuando los medios son tan oscuros?

Comparando la ampolla de ensayo, expuesta e incubada, con la ampolla de control negativo incubada para la determinación del cambio de color.

Russ Nyberg trabaja en la fábrica de Indicadores Biológicos de Mesa Labs de Omaha (anteriormente Raven Biological Laboratories) desde hace 19 años. Ha desempeñado los cargos de Director de Fabricación y Producción y actualmente trabaja en el área de Soporte Técnico.

Russ es miembro del comité y participa activamente en la Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) en los grupos de trabajo Industrial Steam, Resistometer and Process Challenge Device.

Russ tiene el título de B.S. en Biología por la Wayne State University, de B.S.Ed por la University of Nebraska y de MAM por la Bellevue University.

SPORES DON'T LIE®

Sírvanse indicarnos qué temas desearían que abordásemos en "Spore News".

