

- Introducción
- Objetivo
- Fundamento
- Procedimiento
- Bibliografía

Trabajo Práctico N° 3 y N° 4

LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AMBIENTE, SUPERFICIES Y PERSONAL



INTRODUCCIÓN

La limpieza y la desinfección son procedimientos de gran importancia, ya que permiten controlar la presencia de microorganismos sobre las superficies.

La limpieza se define como el proceso de remover físicamente el sucio, el polvo, la grasa, y otros contaminantes de las superficies, equipos, áreas, etc. Para ello generalmente se utilizan detergentes que eliminan el tipo de sustancia presente y que no dañan la superficie a tratar.

La desinfección es un proceso que implica la destrucción de microorganismos perjudiciales (formas vegetativas), a través del uso de sustancias químicas o agentes físicos aplicados sobre superficies inertes. Entre los desinfectantes más utilizados podemos citar los alcoholes, los compuestos de amonio cuaternario, y los compuestos clorados, etc.

La limpieza debe ser un paso previo a la desinfección ya que con este proceso, además de eliminar muchas sustancias que pueden servir como nutrientes para los microorganismos, se eliminan sustancias que pueden impedir que las soluciones desinfectantes actúen eficientemente.

En el Laboratorio de Microbiología estos procesos deben realizarse de rutina, ya que el trabajar con microorganismos exige que se tomen medidas para evitar la contaminación del ambiente, del material de trabajo y del personal.

Si hablamos de empresas en donde se elaboran productos farmacéuticos, cosméticos o alimenticios; la limpieza y la desinfección tienen como finalidad eliminar los desechos y materiales que se han depositado sobre las superficies y reducir o eliminar los microorganismos presentes en los equipos, pisos o techos de la misma. Por tal razón, la limpieza y la desinfección no deben considerarse como el último paso en la manufactura de un producto, sino como el primer paso en la elaboración del siguiente lote.

En las farmacias la limpieza y desinfección también se emplea con mucha frecuencia, sobre todos en las áreas destinadas a la preparación de fórmulas extemporáneas, donde la presencia de microorganismos puede influir en la calidad del producto. En las instituciones de salud como clínicas, hospitales, etc. la limpieza y la desinfección buscan disminuir la transmisión de microorganismos patógenos que pudieran causar alguna enfermedad.

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AMBIENTE, SUPERFICIES Y PERSONAL

El capítulo <1072> de la USP sobre Desinfectantes y Antisépticos, recomienda tener un programa eficaz de limpieza y desinfección para aquellos ambientes controlados en los que se elaboran productos farmacéuticos, de manera de prevenir contaminación microbiana en los mismos. Es por ello que se debe conocer y controlar la calidad microbiológica del aire y de las superficies de trabajo posterior a estos procesos, ya que los microorganismos podrían ser fuente de contaminación para el material con el que estamos trabajando. (Como se demostró en el trabajo práctico N° 2, los microorganismos están presentes en todas partes).

La evaluación de la calidad microbiológica del ambiente nos indica la cantidad de microorganismos que están presentes en un área determinada. Los microorganismos generalmente no están flotando en el aire sino que se encuentran sobre partículas inertes, por ejemplo polvo, gotas de agua, etc. que le sirven como medio de transporte, las cuales pueden depositarse sobre las superficies; es por ello que mientras más limpia es un área, menor será el número de microorganismos presentes en el aire de la misma.

Las personas también son una fuente de contaminación, ya que liberan gran cantidad de partículas al moverse, toser, estornudar, por exfoliación de la piel, etc. Algunas de estas partículas llevan microorganismos que podrían contaminar el material con el que estamos trabajando; en este sentido los antisépticos, deben ser usados por el personal para descontaminar la piel y los tejidos expuestos antes de entrar a las áreas de manufactura.

Por todo lo expuesto anteriormente, es necesario determinar la calidad microbiológica del aire, las superficies y el personal.

CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL AIRE

Existen diferentes métodos que permiten evaluar la calidad microbiológica del aire. Uno de los más utilizados es el método de sedimentación en placas de agar, que consiste en exponer placas con un medio nutritivo sólido al ambiente durante un periodo determinado, incubar las placas y hacer el recuento de las colonias obtenidas. El tiempo de exposición depende del ambiente a evaluar, mientras mayor sea la contaminación menor será el tiempo de exposición de las mismas. Normalmente se utilizan placas de 9 cm de diámetro.

Con este método se detectan los microorganismos que caen sobre la superficie de la placa, lo cual simula lo que ocurre normalmente cuando estamos trabajando en el laboratorio.

Como las condiciones ambientales influyen en la sedimentación de los microorganismos es necesario que, cuando se realiza este método, las placas se expongan siempre en el mismo lugar y bajo las mismas condiciones para poder comparar los resultados obtenidos.

OBJETIVO

Al finalizar el trabajo práctico el estudiante estará en capacidad de:

1. Desinfectar los mesones **al comenzar y al finalizar cada sesión de trabajo**.
2. Evaluar la calidad microbiológica del aire de un área determinada.

FUNDAMENTO

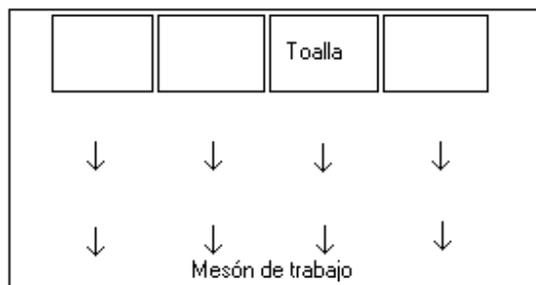
1. Disminuir la contaminación de los mesones de trabajo, previamente limpiados, utilizando desinfectantes.
2. Al exponer la superficie de un medio de cultivo al medio ambiente durante un periodo determinado, los microorganismos que están presentes en él pueden sedimentar sobre el medio de cultivo dando origen a colonias que se pueden contar.

PROCEDIMIENTO

Actividad 1 (Limpieza y Desinfección)

1. Verificar que sobre el mesón de trabajo no exista sucio, polvo, etc.
2. Impregnar una toalla desechable con solución desinfectante (compuesto de amonio cuaternario).

3. Pasar la toalla con el desinfectante sobre la superficie sobre el mesón de trabajo haciendo trazos paralelos de atrás hacia delante.



4. Dejar secar la solución desinfectante antes de comenzar a trabajar.
5. Repetir el procedimiento al finalizar el trabajo práctico.

Actividad 2 (Control Microbiológico del Aire)

1. Marcar con el número de su equipo la tapa de la placa con agar nutritivo que le suministre el profesor y, de acuerdo a su número, exponer la placa en el lugar y durante el tiempo señalado en la siguiente tabla:

Equipo #	Tiempo y lugar de exposición de la placa
1	10 minutos sobre el mesón de trabajo
2	20 minutos sobre el mesón de trabajo
3	30 minutos sobre el mesón de trabajo
4	10 minutos sobre el mesón de la cabina del laboratorio
5	20 minutos sobre el mesón de la cabina del laboratorio
6	30 minutos sobre el mesón de la cabina del laboratorio
7	10 minutos en el pasillo
8	20 minutos en el pasillo
9	30 minutos en el pasillo
10	10 minutos en el área de los baños de maría
11	20 minutos en el área de los baños de maría
12	30 minutos en el área de los baños de maría
13	10 minutos en el baño de caballeros
14	20 minutos en el baño de caballeros

15	30 minutos en el baño de caballeros
16	10 minutos en el área aséptica
17	20 minutos en el área aséptica
18	30 minutos en el área aséptica
19	10 minutos en el baño de damas
20	20 minutos en el baño de damas

2. Incubar la placa a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ en posición invertida durante 48 horas.
3. Contar el número de colonias en la placa.
4. Calcular el número de microorganismos que caen por cm^2 durante 1 minuto.

CÁLCULO DEL NÚMERO DE MICROORGANISMOS POR CM^2

Para calcular la cantidad de microorganismos que cayeron en la placa por unidad de tiempo:

- Contar el número de colonias en la placa. Este número se expresa como ufc (unidades formadoras de colonias), ya que varios microorganismos podrían estar juntos y al multiplicarse sólo se verá una colonia.
- Calcular el área de la placa (A).

$$A = \pi r^2$$

Para una placa de 9 cm de diámetro el área es

$$A = 3,14 \times 4,5^2 \text{ cm}^2 = 63,62 \text{ cm}^2$$

- Calcular el número de microorganismos que caen en el área por unidad de tiempo.

Se puede expresar en: ufc/ placa/ min,
 ufc/ cm^2 / min o
 ufc/ área total/ min.

Ejemplo

Se expone una placa de 9 cm de diámetro en un área durante 30 minutos. Se incubó 24 horas a $32,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se cuentan 25 colonias. Calcular el número de ufc/ placa/ min y ufc/ cm^2 / min.

$$\begin{array}{r} 25 \text{ ufc} \text{ -----} 30 \text{ min} \\ X \quad \text{-----} 1 \text{ min} \end{array} \quad X = 0,833 \text{ ufc/ placa/ min}$$

Si deseamos expresar los valores en ufc/ cm²/ min

$$\begin{array}{r} 0,833 \text{ ufc} \text{ -----} 63,62 \text{ cm}^2 \\ X \quad \text{-----} 1 \text{ cm}^2 \end{array} \quad X = 0,0131 \text{ ufc/ cm}^2 \text{/ min}$$

Es importante asegurarse al momento de comparar los resultados, que éstos están expresados en los mismos parámetros

RESULTADOS

Área evaluada:

Tiempo de exposición de las placas: _____

Cálculos:

Número de microorganismos por cm²: _____

CONCLUSIONES

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE SUPERFICIES

El control microbiológico de superficie nos proporciona información sobre la cantidad de microorganismos presentes sobre una superficie, la cual puede ser un equipo, mesón, ropa, etc. Esta evaluación generalmente se hace utilizando:

- Placas de contacto (RODAC)

Las placas de contacto o RODAC (Replicate Organism Direct Agar Contact) son placas de 55-60 mm de diámetro llenas con medio de cultivo hasta obtener una superficie convexa, que sobresale del borde de la placa. Estas placas pueden prepararse en el laboratorio o adquirirse comercialmente.



Placa Rodac

Generalmente se utilizan para determinar la calidad microbiológica de superficies planas. Para tomar la muestra se abre la placa y se presiona sobre la superficie a ensayar, sin deslizarla. Se tapa la placa y se incuba bajo las condiciones adecuadas. Se cuenta el número de colonias y se calcula el número de ufc/área de la placa, la cual está entre 24 y 30 cm², dependiendo del diámetro de la misma.

NOTA: Es necesario desinfectar la superficie evaluada luego de tomar la muestra, ya que podrían quedar restos del medio de cultivo que favorecen el crecimiento de los microorganismos.

- Método del Hisopo

Se recomienda para tomar muestras de superficies irregulares donde no se pueden utilizar placas RODAC. Se debe definir el área donde se va a tomar la muestra, generalmente se usa una plantilla con un área entre 24 y 30 cm². El hisopo estéril se humedece en un diluyente y se frota sobre la superficie a evaluar, en por lo menos dos direcciones distintas, rotándolo ligeramente. Luego la punta del hisopo se coloca en el diluyente y se toman alícuotas para sembrarlas en placas con agar. Se incuba y se cuenta el número de colonias. Se calcula el número de ufc/área.

CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL PERSONAL

Para evaluar al personal se pueden utilizar placas RODAC, las cuales se presionan sobre su vestimenta. Cuando queremos detectar la presencia de microorganismos en las manos del personal se pueden usar placas con medio de cultivo (Touch plates), el personal toca el agar de dichas placas con la punta de los de-

dos, luego se incuban por el tiempo y bajo las condiciones adecuadas. Al final del periodo de incubación se cuentan las colonias.

NOTA: El personal debe lavarse y desinfectarse las manos luego de tocar las placas, ya que podrían quedar restos del medio de cultivo en los dedos y favorecer el crecimiento de los microorganismos.

Actividad 3 (Control Microbiológico de Superficies)

1. Seleccionar para el muestreo una sección del mesón, del piso, pared, etc. que tenga una superficie de 25 cm², según lo indique el profesor.
2. Identificar la placa con los datos necesarios.
3. Retirar la tapa de la placa RODAC y presionar suavemente la superficie del agar sobre el área de muestreo elegida.
4. Tapar la placa e Incubar durante 24-48 horas a 32,5 ± 2,5°C.
5. Limpiar con solución desinfectante el área muestreada, para eliminar los residuos de agar.

Nota: La superficie delimitada por las placas es de 25 cm², por lo que el resultado se expresa en ufc/25 cm² / placa rodac.

BIBLIOGRAFÍA

Carlberg, D. 1995. Cleanroom Microbiology for the Non Microbiologist. Interpharm Press, Inc. Buffalo Grove, Illinois.

Clavell, L.; Pedrique de Aulacio, M. 1992. Microbiología. Manual de Métodos Generales (2^{da} edición). Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

De Rossi, L.; Clavell, L. 2000. Área Limpias. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

Farmacopea de los Estados Unidos. <1116>Evaluación microbiológica de áreas limpias y otros ambientes controlados. 31ed. Rockville; 2008

Repáraz, F.; Arina, P.; Artajo, P.; Sánchez, M.T.; Escobar, E. Octubre 2001. Higiene y Desinfección en el Hospital. Anales. Suplemento 2.

URL: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/suple11/suple8.html>

Tortora G.J., B.R. Funke and C.L. Case. 2007. Introducción a la Microbiología. 9 Edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires.

Prof. Sofía Gutiérrez de Gamboa

Prof. Luisa Rossi Devivo

Octubre 2001

Actualizado por

Prof. Alessandra Garcés

Prof. Katuska Saravia

2008