

Metodología de esterilización en el laboratorio microbiológico

**Blanca Pérez-Uz. M. Isabel de Silóniz.
Begoña Torralba. Covadonga Vázquez.**

Departamento de Microbiología III. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense.

C/José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid.

perezuz@bio.ucm.es siloniz@bio.ucm.es btorralb@bio.ucm.es covi@bio.ucm.es

Resumen: El trabajo de laboratorio en microbiología requiere siempre ciertos mecanismos de control de las poblaciones microbianas. La esterilización es uno de los mecanismos más utilizados y las técnicas de esterilización aplicables dependen directamente de las características del material de trabajo o de los medios que se vayan a tratar. La esterilización puede ser preparativa, en la que los materiales y medios a utilizar en el laboratorio o durante distintos procesos microbiológicos deben ser esterilizados antes del mismo trabajo. Pero también es necesaria la esterilización antes de desechar el material ya utilizado y contaminado en el laboratorio, en cuyo caso se habla de esterilización final. En este documento se describen las técnicas de esterilización más habitualmente utilizadas en un laboratorio de microbiología general y de metodologías de control de la esterilización.

Palabras clave: Esterilización, Autoclave, tindalización, horno Pasteur, filtración.

INTRODUCCIÓN

La **esterilización** es un mecanismo por el que se consigue la muerte o eliminación de todos los microorganismos vivos de una muestra, medio, superficie o material de trabajo (LEAHY *et al.*, 1999). Entre los microorganismos vivos se incluyen bacterias, hongos, protistas, virus y sus formas de resistencia. Un objeto esterilizado está, por lo tanto, totalmente libre de microorganismos incluyendo sus formas de resistencia. No hay que confundir la esterilización con la **desinfección** en la que no se eliminan todos los microorganismos, sino únicamente aquellos que pueden causar enfermedad o efectos deletéreos sobre los productos en los que se encuentran (en alimentos, cosméticos, etc). Un objeto desinfectado, por lo tanto, no está estéril.

La esterilización se consigue generalmente por métodos físicos y excepcionalmente por la aplicación de compuestos químicos. Entre los **métodos físicos** más comunes está la aplicación de calor (calor húmedo o calor seco), la filtración o las radiaciones. La esterilización sin embargo también se puede conseguir mediante la aplicación de algunos **productos químicos**, como el óxido de etileno, formaldehído o

glutaraldehído. La desinfección se realiza generalmente mediante agentes químicos, que pueden ser desinfectantes o antisépticos dependiendo del uso práctico que tengan. Los últimos deben ser compatibles con los tejidos biológicos, pues se aplicarán en la superficie corporal.

En el laboratorio de Microbiología la esterilización se puede utilizar como esterilización preparativa o como esterilización final. La **esterilización preparativa** es la que se realiza para mantener libre de microorganismos el material que vamos a utilizar antes de empezar el trabajo en sí mismo o durante el proceso de trabajo (placas Petri, pipetas, medios de cultivo, asas de siembra, hisopos, etc.). La **esterilización final** sin embargo tiene como único fin destruir los microorganismos con los que se ha estado trabajando. En el primer caso, la elección del proceso de esterilización se debe adecuar para preservar las características de los diversos materiales o medios a esterilizar, pues algunos pueden ser susceptibles de ser destruidos o alterados, durante los mecanismos de esterilización. Sin embargo, en la esterilización final no es necesario considerar ni el tipo de medio de cultivo, ni la posible alteración de materiales, excepto para tener la constancia de que el proceso ha conseguido su finalidad, es decir, la muerte de todos los microorganismos.

METODOLOGÍAS DE ESTERILIZACIÓN PREPARATIVA

La esterilización preparativa o final se puede realizar, como se ha indicado por mecanismos físicos o químicos (Tabla 1). El mecanismo físico más utilizado es el calor, ya sea húmedo o seco (Tabla 1). Sin embargo, cuando estas metodologías físicas no son aplicables, por las características del material o medio a esterilizar, la filtración o la radiación son los mecanismos a elegir. Excepcionalmente y sobre todo en aplicaciones a material de uso sanitario, donde no se pueden utilizar las metodologías ya reseñadas, se utiliza generalmente algún tipo de esterilización fría. La esterilización fría se lleva a cabo en dispositivos cerrados donde se emplea un agente químico gaseoso, como el óxido de etileno, el formaldehído o líquidos como el glutaraldehído.

Agente esterilizante	Equipo
Calor húmedo	Autoclave
Calor seco	Horno Pasteur Mechero
Filtración	Filtros membrana Equipos filtración Filtros HEPA
Radiación	Fuente Rayos gamma Fuente Rayos X
Óxido etileno	Cámara
Glutaraldehído	Cámara

Tabla 1. Mecanismos de esterilización.

Autoclave (calor húmedo)

El calor húmedo por medio de utilización de **vapor de agua** es el agente esterilizante más frecuentemente utilizado. Este mecanismo destruye eficazmente los microorganismos por desnaturalización de proteínas y enzimas, y desestabilización de membranas.

La esterilización con calor húmedo, se utiliza principalmente con el autoclave. El **autoclave**, desarrollado por CHAMBERLAND en 1884, es un aparato (Fig. 1) constituido por una caldera, que se puede cerrar herméticamente con una tapa metálica y que presenta una resistencia eléctrica en su interior (antiguamente por gas) que calienta el agua. Este aparato permite que en el interior de la caldera se desplace el aire por una válvula de purga, dejando que se acumule posteriormente **vapor saturado a presión**, que alcanza temperaturas superiores a los 100°C sin que se produzca ebullición.



Figura 1. Autoclaves: actual (izquierda) y antiguo (derecha).

El material a esterilizar se introduce en el interior de la cámara, se somete al vapor de agua con sobrepresión (lo más común: 1,1 atmósferas), hasta alcanzar temperaturas adecuadas para la eliminación de los microorganismos y todas las formas de resistencia, sin que se produzca ebullición de los medios líquidos. Las temperaturas y los tiempos de exposición pueden variar dependiendo del material a esterilizar (LEWIS, 2002). Actualmente, los autoclaves controlan automáticamente la temperatura, la presión y el tiempo de exposición, para esto están provistos de un **manómetro** que permite regular la presión y por lo tanto la temperatura, y un temporizador que permite ajustar el tiempo de exposición automáticamente (Fig. 2). El equipo suele incluir además una **válvula de seguridad**.



Figura 2. Controles de temperatura (A), tiempo (B) y presión (C) en un autoclave actual.

El procedimiento más habitual de esterilización consiste en someter el material a una temperatura de 121°C (1,1 atmósferas o 15 lb/in² o p.s.i.), durante 20 minutos. Sin embargo, estos parámetros se pueden modificar dependiendo de la composición, naturaleza del medio (densidad) o el volumen a esterilizar, etc. El proceso, en cualquier caso, debe garantizar que se alcanza la temperatura adecuada en todo el volumen a esterilizar, por lo que se debe permitir el acceso del vapor de agua, evitando los empaquetados o cerramientos herméticos. Si el volumen a esterilizar es muy grande o la densidad (en caso de líquidos) es elevada, normalmente se debe aumentar el tiempo de exposición o la temperatura (Tabla 2). Generalmente, los cambios de parámetros adecuados a cada medio o material suelen indicarse en las instrucciones del autoclave.

Temperaturas	Presiones		Tiempos Exposición
	T°C	kPa	
100	0	0	>60
116	69	10	60
121	104	15	15 ¹ -20 ²
132	186	27	3-8 ¹ /10 ²

1. Material sin envolver; 2: material envuelto. PSI = 1 atm

Tabla 2. Temperaturas y presiones características de esterilización en autoclave.

El autoclave se puede utilizar para la esterilización de medios de cultivo ya sean sólidos (agares) o líquidos, soluciones, material de vidrio, gomas o ciertos tipos de plásticos (policarbonato o polipropileno), acero inoxidable y también material de trabajo como ropas, algodón, gasas, etc. También es un mecanismo que se utiliza para esterilización final de medios de cultivo.

La esterilización con calor húmedo puede causar corrosión de algunos materiales, por lo tanto, no será el método a elegir cuando esto sea un problema. También se debe tener en cuenta que en el proceso de esterilización de medios, puede bajar el pH entre 0,3 y 0,5 unidades, puede caramelizar azúcares y algunos compuestos volátiles se pueden destruir durante el proceso. Los procesos de esterilización largos pueden producir una precipitación de sales.

Tindalización (calor húmedo)

La **tindalización** es un método de **esterilización fraccionada** con calor que se aplica para esterilizar materiales y medios de cultivo **termosensibles**, que no pueden someterse a temperaturas superiores a los 100°C. La denominación de este proceso es un homenaje al físico John Tyndall que describió formas bacterianas con una elevada resistencia al calor, diseñando esta metodología para su eliminación. Actualmente el proceso de tindalización se lleva a cabo en autoclave con la válvula abierta de modo que no se produzca sobrepresión y por lo tanto, no se alcanzan temperaturas superiores a las de ebullición (100°C).

El procedimiento consiste en aplicar tratamientos térmicos de 30 minutos a 100°C durante tres días consecutivos, dejando el material a temperatura ambiente o a 37°C en intervalos de 24 horas. Las temperaturas cercanas a los 100°C destruyen las formas vegetativas pero no las **endosporas bacterianas**, por eso se requiere la realización de tres periodos de tratamientos consecutivos con el fin de permitir el desarrollo de las formas esporuladas en los intervalos a temperatura ambiente.

Este procedimiento se puede utilizar en medios de cultivo con azúcares, gelatina, sueros o huevo que se descomponen a temperaturas elevadas. También se suele utilizar de forma aplicada en el control de microorganismos en alimentos.

Horno Pasteur (calor seco)

La esterilización puede llevarse a cabo mediante calor seco y en este caso se realiza en una estufa denominada **horno Pasteur** (Fig. 3), en cuyo interior se disponen los materiales que van a ser esterilizados debidamente protegidos con papel satinado, o en contenedores especiales para evitar la contaminación ambiental una vez finalizado el proceso y hasta su utilización. La destrucción microbiana se produce por oxidación de los componentes celulares y desnaturalización de proteínas. Este es un proceso menos eficaz por la ausencia de agua y por lo tanto deben incrementarse tanto las temperaturas como los tiempos de exposición.



Figura 3. Horno Pasteur.

La esterilización mediante este tratamiento, debe alcanzar temperaturas entre 160°-180°C y el tiempo de tratamiento oscila entre 3 horas y 30 minutos en función de la temperatura seleccionada (Tabla 3).

Material	Temperatura (°C)	Tiempo exposición (min)
Envuelto	170	60
	160	120
	150	150
	140	180
	121	12hrs
Sin envoltorio (rapid flow)	190	6
Envuelto (rapid flow)	190	12

Tabla 3. Temperaturas y tiempos característicos de esterilización en horno Pasteur.

El horno Pasteur se utiliza para esterilizar productos u objetos de porcelana o vidrio como pipetas, probetas, embudos, y generalmente aquellos materiales metálicos que no se pueden esterilizar en autoclave por problemas de corrosión y también fluidos oleaginosos. En general material o medios que resisten las temperaturas más elevadas que se utilizan en este aparato.

Flameado (calor seco)

La esterilización rápida durante los procedimientos de trabajo en microbiología se realiza por **flameado** (Fig. 4), mediante la exposición directa y breve de los materiales a la llama de un mechero. Este procedimiento está especialmente indicado para la esterilización de agujas y asas de siembra, o para la boca de los tubos y matraces, ya estériles o con cultivos, durante los procedimientos habituales de manipulación de microorganismos y/o medios estériles.

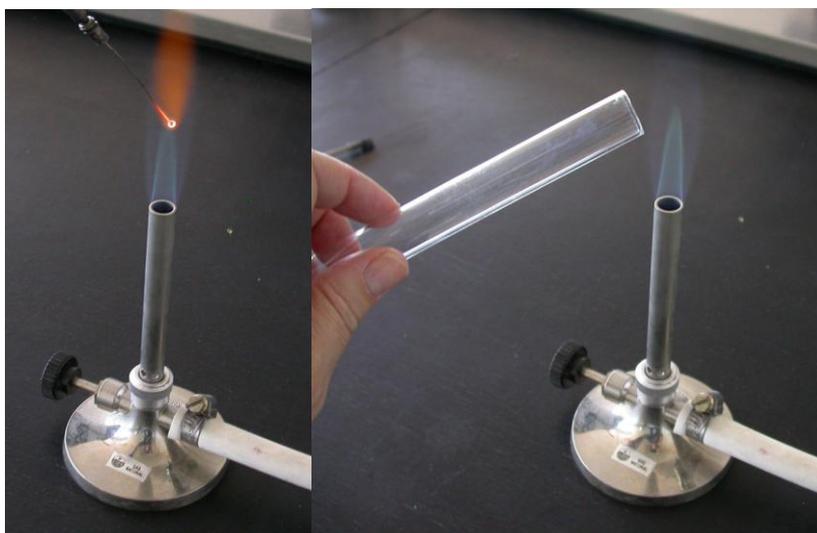


Figura 4. Flameado de asa de siembra o material de vidrio.

Filtración

Las aplicaciones de la esterilización por filtración son diversas en el campo de la microbiología, se puede aplicar para eliminar microorganismos de soluciones, fluidos o gases o para la esterilización del ambiente de trabajo, en todos los casos los microorganismos no son destruidos sino que son retenidos físicamente o adsorbidos por los filtros con un tamaño de poro adecuado. El tamaño de poro que se considera en la actualidad esterilizante es el de $0,22\ \mu\text{m}$ aunque más recientemente se tiende a la utilización de poros de $0.1\ \mu\text{m}$ (MELTZER y JORNITZ, 2006). Se describen a continuación los tipos de filtros más utilizados y sus aplicaciones más relevantes.

- **Filtros de membrana.** Se utilizan para esterilizar soluciones termolábiles como son antibióticos, vitaminas, medios de cultivo líquidos que contienen azúcares a concentraciones elevadas que pueden caramelizar, o proteínas que pueden desnaturalizarse por el calor, de tal forma que los microorganismos quedan retenidos en el filtro, y el líquido filtrado se encuentra estéril.

Los filtros son de muy variada composición dependiendo de su aplicación, normalmente son de ésteres de celulosa (acetato de celulosa, nitrato de celulosa) politetrafluoretileno (PTFE o teflón), fluoruro de polivinilo hidrofóbico (PVDF), etc. Dependiendo del volumen a esterilizar son de distinto tamaño (diámetro) y se utilizan en distintos mecanismos. Para volúmenes grandes, la solución se pasa a través del filtro montado sobre un soporte y conectado a una bomba de vacío que facilita la succión (Fig. 5). Previamente a la filtración se debe esterilizar todo el equipo que va a estar en contacto con la solución a esterilizar, como el soporte y embudo para filtros y el kitasato que recibirá el medio estéril. Todo este material puede ser de vidrio o de policarbonato o polietileno esterilizables.

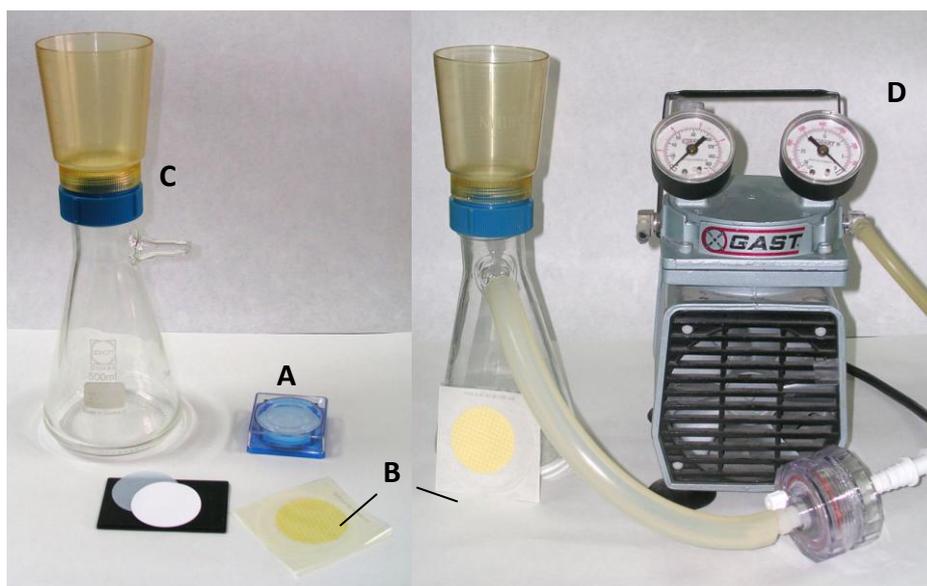


Figura 5. Mecanismo de filtración de volúmenes grandes. A. Filtros sin esterilizar. B. Filtros estériles por radiación gamma. C Soporte para filtros. D. Bomba de vacío.

Algunos filtros se venden previamente esterilizados por radiación gamma (ver apartado radiaciones) en carcasas plásticas (Fig. 6 A) o en bolsas herméticas (Fig. 6 B).

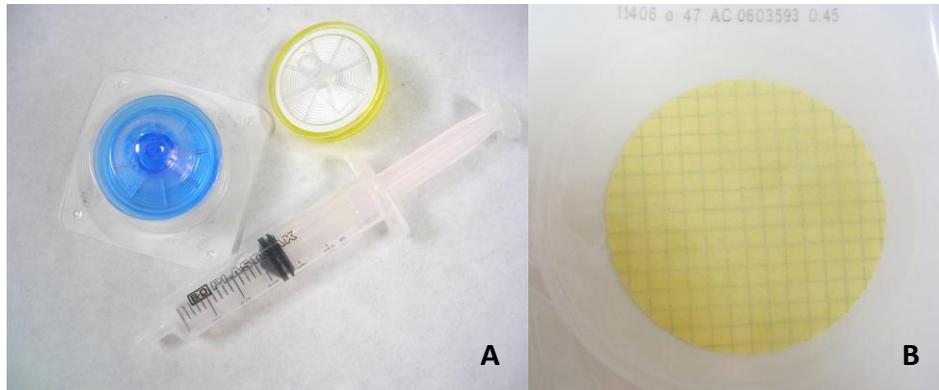


Figura 6. Mecanismos de filtración de volúmenes pequeños. Filtros estériles por radiación gamma para utilizar con jeringuilla (A) o con embudo de filtración (B).

Los microorganismos son retenidos en el filtro y por lo tanto el fluido filtrado está estéril. La retención se hace en función del tamaño de poro existiendo filtros de diferente tamaño, los más habituales en microbiología han sido los de 0,45 y los de 0,22 μm . Estos filtros retienen la mayoría de los microorganismos pero no virus, ni algunas bacterias pequeñas (micoplasmas), por lo que últimamente se están utilizando de hasta 0,1 μm para aumentar el espectro de los microorganismos retenidos (MELTZER y JORNITZ, 2006; GOMEZ y MOLDENHAUER, 2009).

- **Filtros de profundidad.** Son columnas de materiales fibrosos o porosos (tierra de diatomeas, lana de vidrio, materiales cerámicos porosos) que permiten retener las partículas, en este caso microorganismos y que normalmente se utilizan para la esterilización de gases o como prefiltros para otros filtros esterilizantes. Los filtros de seguridad son importantes para las aplicaciones de bioseguridad. Estas pueden desarrollarse en una cabina de seguridad biológica con flujo de aire que pasa previamente a través de un filtro de profundidad llamado filtro de aire particulado de alta eficacia (HEPA).
- **Filtros HEPA.** Buena parte de las manipulaciones propias de la microbiología deben realizarse en condiciones de esterilidad total para evitar la contaminación de los medios o cultivos y la seguridad de los trabajadores, para ello se usan las cabinas de seguridad biológica con flujo de aire **campanas o cámaras de flujo laminar** (Fig. 7), se trata de equipos que crean un área de trabajo libre de partículas contaminantes, pasando el aire ambiente a través de filtros y produciendo un flujo laminar sobre la zona de trabajo que provoca una presión positiva constante que previene la infiltración de aire contaminado y se mantiene así la zona en esterilidad.



Figura 7. Campana de seguridad biológica con flujo de aire

La esterilidad en estas cámaras se consigue mediante el sistema de filtración del aire, generalmente filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air), formados por una matriz de fibras de fibra de vidrio. Estos filtros retienen partículas de hasta 0,3-0,12 micrómetros (μm) de diámetro y pueden estar montados en cámaras de flujo laminar de distinto tipos, en función del riesgo para el manipulador (normativa UNE-EN 12469). En éstas el aire ambiente se pasa a través de un prefiltro y un filtro HEPA antes de entrar en la zona de trabajo manteniendo una velocidad media del aire en esa zona entre 0,4 y 0,5 m/s que produce una barrera o cortina de aire estéril. Hay cámaras de **flujo vertical** donde la corriente de aire se establece desde la parte superior a la inferior, creándose así una cortina vertical de aire estéril que protege a la persona que está trabajando con microorganismos de riesgo, y a los cultivos o medios de contaminación externa. También hay campanas de **flujo horizontal**, el aire del exterior es absorbido horizontalmente y que se emplean para trabajos con microorganismos que no reporten riesgos para el operador.

Las cámaras suelen estar provistas además de lámparas UV que mantienen el interior estéril (ver radiaciones), mientras no se utilizan, o inmediatamente antes de su uso. Externamente suelen presentar unos indicadores con las horas de utilización (para el control de la vida útil del filtro HEPA), luz ultravioleta, luz visible, etc.

Radiaciones

Las radiaciones de distinto tipo se utilizan también en microbiología con la finalidad de la esterilización (LAMBERT y HANSEN, 1998). La más utilizada en el laboratorio de microbiología es la **radiación ultravioleta** (UV) de una longitud de onda de unos 260 nm. Aunque suele ser poco eficaz debido a su escaso poder de penetración en los materiales, tales como vidrio, agua, películas de suciedad, sin embargo, es muy útil para esterilizar el aire y las superficies, así, se suelen colocar en cabinas de flujo laminar, en habitaciones estériles, quirófanos, etc.

Otras radiaciones, como los **rayos gamma**, radiaciones electromagnéticas más penetrantes, por su menor longitud de onda (<0,1 nm), suelen ser más efectivas como agentes esterilizantes, pero suelen tener menor uso en el laboratorio microbiológico y sin embargo, un uso industrial muy extendido. Son la opción adecuada para esterilizar equipos o medios sensibles al calor, así se emplean por ejemplo para la esterilización de material plástico de un solo uso o para material quirúrgico desechable, para ciertos alimentos, etc.

Esterilizantes gaseosos

Dentro de este apartado incluimos todos aquellos compuestos químicos que se suelen utilizar como esterilizantes, y que se suelen utilizar en fase gaseosa generalmente. Entre estos compuestos ya hemos mencionado el óxido de etileno o el formaldehído. Estos suelen utilizarse para esterilizar materiales sensibles al calor o que no pueden someterse a radiaciones. Sus aplicaciones suelen darse en la industria farmacéutica o en medicina. El compuesto más utilizado es el **óxido de etileno**, que actúa por medio de su actividad alquilante sobre los hidrógenos lábiles en ácidos nucleicos y otras macromoléculas, inactivándolas. El proceso de esterilización en estos casos suele darse en cámaras herméticas y suele requerir en general tiempos de exposición largos (30 minutos - 18 horas). Aunque procesos a temperaturas entre 60-80°C pueden disminuir el tiempo de exposición (30 min-6 h) (BLOCK, 2001). Suele ser poco usado en el trabajo rutinario del laboratorio microbiológico.

METODOLOGÍAS DE ESTERILIZACIÓN FINAL

Su finalidad es destruir los microorganismos con los que se ha trabajado y descontaminar el material utilizado antes de que sea desechado. Generalmente se hace por calor húmedo en autoclave, o por incineración.

Cuando se utiliza el **calor húmedo** en autoclave, por ejemplo a 121°C, durante 20 minutos; la temperatura y tiempo de elección son irrelevantes, siempre que sean esterilizantes, ya que las precauciones para evitar la alteración de medios de cultivo y materiales en este caso, ya no tienen importancia. El material contaminado (placas, tubos, medios, etc) se suele introducir en bolsas especiales para su utilización en

autoclave (Fig. 8), que se colocan en contenedores apropiados para las condiciones usadas en el autoclave.

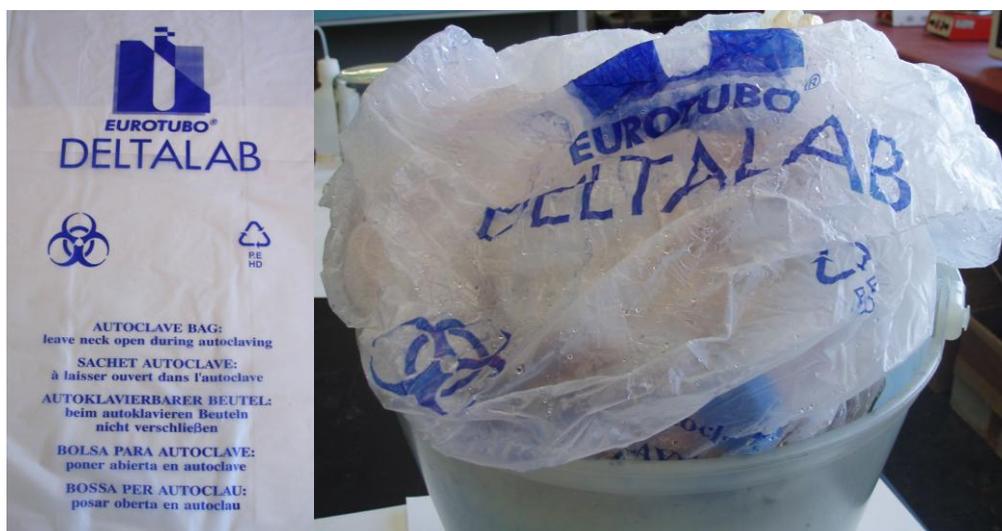


Figura 8. Bolsas autoclavables para esterilización y bolsa conteniendo material para eliminar ya esterilizado, en un contenedor apropiado.

Incineración (calor seco)

La esterilización de cierto tipo de material por **incineración**, se realiza en aquel material contaminado de desecho antes de ser eliminado. Este procedimiento es característico en la eliminación de material sanitario desechable contaminado. En este caso, se suelen utilizar contenedores apropiados de un solo uso (Fig. 9) que tienen cierre hermético una vez llenos. En estos se recolecta el material contaminado (puntas, agujas, gasas, etc) y serán posteriormente incinerados con su contenido.



Figura 9. Contenedores de diversos tamaños para la eliminación de material contaminado para incineración.

CONTROL DE LA ESTERILIZACIÓN

Los procesos de esterilización deben disponer de sistemas o mecanismos que nos permitan garantizar y controlar que el proceso se ha realizado con éxito. Existen diferentes mecanismos para ello:

- Sistemas de **control físico**. Lo más básico es el control mecánico de las temperaturas (sensor de temperatura) que permita realizar un registro de las temperaturas alcanzadas en el interior durante todo el proceso. Son sistemas requeridos en los laboratorios acreditados.
- Sistemas de **control químico**. Son habitualmente sistemas constituidos por cintas adhesivas impregnadas en compuestos químicos termosensibles, sensibles a radiaciones o al óxido de etileno que cambian de color si el proceso se ha desarrollado de forma correcta, es decir, si se ha alcanzado la temperatura adecuada, si ha sido irradiado, o si ha estado expuesto a óxido de etileno. Estas tiras se adhieren al material a esterilizar de forma que el cambio de color supone una garantía de la temperatura alcanzada. Se utiliza de forma rutinaria en los laboratorios de microbiología (Fig. 10).



Figura 10. Cinta adhesiva termosensible para el control de esterilización por calor.

- Sistemas de **control biológico**. Se refieren a la utilización de microorganismos o esporas resistentes a distintos procesos de esterilización, como temperaturas elevadas, óxido de etileno, etc. Estas bacterias vienen preparados en tiras impregnadas o en suspensiones en ampollas cerradas que se exponen al proceso de esterilización, por ejemplo en autoclave, junto con el material que se va a esterilizar. Una vez finalizado el proceso, se cultiva el microorganismo en las condiciones habituales en microbiología. La ausencia de crecimiento después de un tiempo prudencial de incubación en las condiciones adecuadas significa que el proceso de esterilización es correcto. Para este fin se suele trabajar con bacterias que forman endosporas por su especial característica de resistencia (especialmente termorresistencia) a distintos procesos de

esterilización, por ejemplo, algunas especies del género *Bacillus* (*Bacillus stearothermophilus*, *B. subtilis* var. *Níger*, *B. pumilus*) son utilizadas comúnmente como organismos de validación de esterilización en los autoclaves de vapor.

ESTANDARES DE ESTERILIZACIÓN

La validación de calidad en los procesos de esterilización, sigue una normativa publicada y consensuada en las **normas ISO** (International Organization for Standardization) que está específicamente creada para productos utilizados en salud, y material médico, aunque realmente muchos de ellos sirven para cualquier proceso de esterilización. En los últimos años, los estándares de esterilización europeos (EN 550, EN 552 y EN 554), fueron revisados para convertirse en estándares ISO. Previamente las normas ISO relacionadas con estas (ISO 11135, ISO 11137 e ISO 11134 respectivamente) también fueron reemplazados (ver recursos electrónicos: Global Sterilization: Making the Standards Standard y Changes in sterilization standards). Estas normas se han ido publicando sucesivamente en varios años en nuevos documentos que se detallan a continuación (Tabla 4). Los nuevos estándares siguen un formato común, proporcionando definiciones consistentes y utilizando un sistema de calidad común.

En estas normativas se detallan los procesos y mecanismos adecuados y consensuados de calidad en la utilización de esterilización, y que son requeridos a todos aquellos laboratorios de microbiología que pretendan obtener una certificación de calidad.

Norma	Protocolo Esterilización	Publicaciones
ISO 17665-1:2006	Calor (Húmedo)	
ISO/TS 17665-2:2009	Calor (Húmedo)	
ISO 25424:2009	Esterilización con vapor a baja temperatura y formaldehído.	
ISO 11137:2006	Radiación	Parte 1 Parte 2 Parte 3
ISO 11135:2007	Óxido de etileno	Parte 1 Parte 2
ISO/TS 11135-2:2008	Óxido de etileno	
ISO 14161:2009	Indicadores Biológicos	
ISO 11138:2006	Indicadores Biológicos	Parte 1 Parte 2 Parte 3 Parte 4 Parte 5

Tabla 4. Normas ISO sobre esterilización (Sterilization of health care products or medical devices) y control de esterilización.

BIBLIOGRAFÍA

- Block, S.S. 2001. *Disinfection, sterilization and preservation*. 5th Ed. Lippincott Williams y Wilkins Eds. Philadelphia.
- Chamberland, C. 1884. Sur un filtre donnant de l'eau physiologiquement pure. *Compt. Rend. Acad. d. sc. Paris*. XCIX: 247.
- Gomez, M. y Moldenhauer, J. 2009. *Biological indicators for sterilization processes*. PDA Books. Davis Healthcare International Publishing, LLC. Bethesda.
- Lambert B.J. y Hansen J.M. 1998. ISO radiation sterilization standards. *Radiation Physics and Chemistry*, 52 (1): 11-14.
<http://www.ingentaconnect.com/content/els/0969806x/1998/00000052/0000001/art00025>
- Leahy, T.J.; Kerry, L.R. y Christopher, M.R. 1999. Microbiology of sterilization processes. En: *Validation of pharmaceutical processes: sterile product*. Carleton, F.J. y Agalloco, J.P. Ed. Pp: 353-380.
- Lewis, R.E. 2002. *Practical guide to autoclave validation*. Pharmaceutical Engineering. ISPE 2002.
<http://www.idc-ch2m.com/Papers/IDC2002%20autoclave.pdf>
- Meltzer T.H. y Jornitz, M.W. 2006. Chapter 1. The sterilizing filter. En: *Pharmaceutical Filtration: The Management of Organism Removal*. PDA Books. Pp. 4-21.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

- Alfa Medical Equipment. (15-07-09). Autoclave temperature and time tressure thart.
<http://www.sterilizers.com/autoclave-time-temperature-pressure-chart.html>
- Global Sterilization: Making the standards Standard. Medical device & diagnostic industry, Marzo, 2005.
<http://www.devicelink.com/mddi/archive/05/03/008.html>
- Changes in sterilization standards. 2007.
<http://www.bsiamerica.com/en-us/Sectors-and-Services/Industry-sectors/Healthcare-and-medical-devices/eUpdates/2007/Changes-in-sterilization-standards/>

Recibido: 17 marzo 2010.

Aceptado: 30 marzo 2010.