

Esterilización por Plasma de Gas de Microorganismos y Mecanismos de Acción

Resumen

El uso de plasmas de gas verdaderos para la inactivación de microorganismos es un área de investigación dinámica. Se utilizan muchos tipos de gases como fuente de plasma, y se han aplicado diferentes métodos de producción de plasma. Los mecanismos antimicrobianos de los plasmas de gas basados en oxígeno pueden deberse a un efecto de grabado en las estructuras microbianas, particularmente en las esporas bacterianas, lo que resulta en un encogimiento. En contraste, los mecanismos definitivos de acción de otras fuentes de plasma de gas, como los gases N₂, He, Ne, Ar y Xe, no se han definido claramente y, de hecho, pueden ser distintos. Los mecanismos especulados de estos plasmas de gas involucran el ataque directo de metastables (moléculas excitadas), UV y/o VUV a las estructuras microbianas, específicamente la membrana interna y el ADN en el núcleo de las esporas bacterianas. Según esta especulación, las figuras de esporas esterilizadas permanecerían sin cambios. Sin embargo, estos mecanismos aún deben ser aclarados. Las perspectivas futuras sobre el uso de plasma de gas para la esterilización son de interés, ya que es posible que se puedan obtener niveles apropiados de garantía de esterilidad en paralelo con la compatibilidad de materiales y funcionalidad. Los métodos tradicionales de esterilización a menudo tienen limitaciones en estos requisitos. Por lo tanto, la esterilización por plasma de gas puede resultar ser un procedimiento de esterilización alternativo apropiado.

Palabras clave: esterilización por plasma de gas, gas de oxígeno, gases raros, grabado, UV al vacío.

Introducción

El plasma se define como un gas ionizado (o energizado) con un número igual de partículas cargadas positivamente y negativamente. A menudo se considera el "cuarto estado de la materia" (siendo los otros tres sólidos, líquidos y gases), porque, aunque el plasma no es ni un gas ni un líquido, sus propiedades son similares a las de ambos. El plasma se puede clasificar en base a su temperatura como de alta o baja temperatura. Un buen ejemplo de plasma de alta temperatura que ocurre de manera natural es el rayo. Este tipo de plasma puede ser generado artificialmente mediante un arco de alta temperatura y alto voltaje, que es la base del proceso de descarga de corona y de las antorchas de plasma utilizadas para vaporizar y redepositar metales. Los plasmas de baja temperatura, utilizados en modificación de superficies, limpieza, descontaminación y aplicaciones de esterilización, son gases ionizados generados en condiciones de vacío profundo (baja presión). Estos plasmas operan dentro de una cámara de vacío en la que los gases atmosféricos se han introducido en la cámara, que generalmente se evacua por debajo de 0.1 Torr. Estas bajas presiones permiten un camino libre relativamente largo para los electrones y iones acelerados dentro de la cámara. Dado que estos iones y partículas neutras están a temperaturas ambientales o cerca de ellas y el largo camino libre de electrones a altas temperaturas o niveles de electronvoltios tiene relativamente pocas colisiones con moléculas a esta presión, las condiciones generales de exposición se mantienen a baja temperatura.

Para algunas aplicaciones, la esterilización a presión de vacío profundo no puede utilizarse, y se han propuesto plasmas atmosféricos. La vida útil de las especies reactivas del plasma en condiciones atmosféricas es mucho más corta que la del plasma a baja presión. Como resultado, la mayoría de las especies activas del plasma, con la excepción de los metastables (átomos electrónicamente excitados de larga duración), pierden su reactividad dramáticamente en una posición remota. Según un informe, el equipo de plasma pulsado atmosférico o de un tercio de presión atmosférica puede ser más deseable (1).

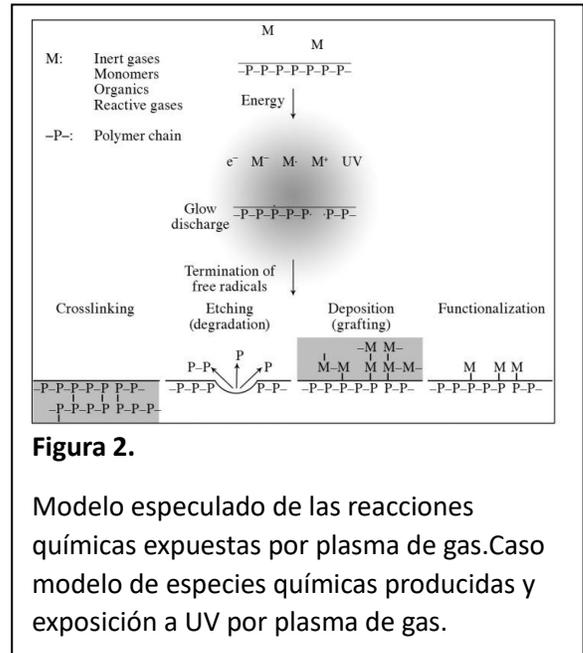
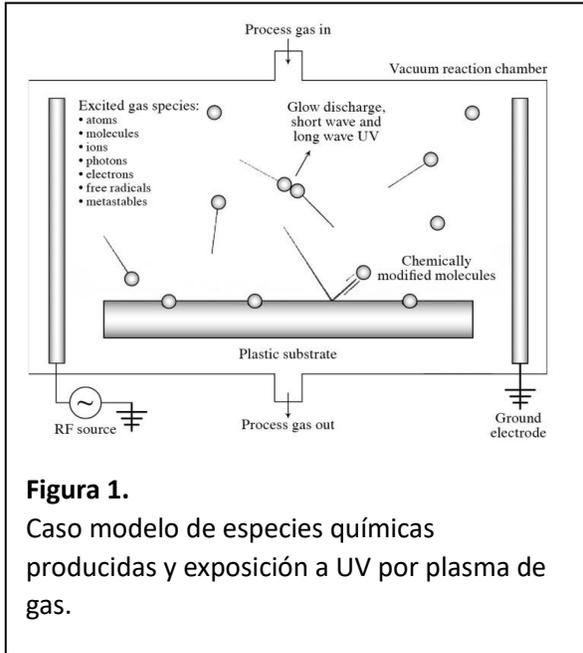
Es importante destacar que los procesos de descontaminación por plasma "verdadero" no se han utilizado ampliamente hasta la fecha. En cambio, una variedad de procesos basados en gas de peróxido de hidrógeno que utilizan plasma como parte del proceso de esterilización se consideran comúnmente como "esterilización por plasma". Sin embargo, ahora se sabe que los mecanismos de acción antimicrobiana en estos procesos se deben principalmente al gas de peróxido de hidrógeno (o gas condensado) y no al plasma, aunque se sabe que la fase de generación de plasma de estos procesos ayuda en la descomposición del peróxido residual en la carga de la cámara (2).

Existen varios informes sobre el uso potencial de los plasmas para aplicaciones de esterilización, en particular la demostración de actividad antimicrobiana de amplio espectro (especialmente esporicida) y la cinética de esta actividad a lo largo del tiempo. Este es un requisito importante para la demostración de cualquier proceso de esterilización, tal como se describe en las normas internacionales (3). Se han informado y discutido varios tipos de gases fuente y procedimientos de producción de plasma de gas (4,5). Como enfoque en este artículo de revisión, consideramos una serie de variables que pueden haber sido pasadas por alto y malinterpretadas en estudios previos. Una de ellas es el fenómeno de cola observado en estudios de inactivación microbiana. Esta es una variable importante en el diseño de un proceso de esterilización por sobreexposición típico y puede deberse a varios factores, incluidos artefactos en el método de prueba, como el agrupamiento de esporas en un indicador biológico (IB). El agrupamiento de esporas puede tener los mismos efectos que la materia orgánica en interferir con la eficiencia de esterilización del plasma de gas en tales investigaciones. El fenómeno de cola comúnmente informado para investigaciones de esterilización por plasma ha sido investigado y aclarado utilizando IBs sin agrupamiento. Otra consideración es el uso de la llamada "esterilización por plasma de gas inerte" y las diferencias en sus mecanismos de acción. El uso de gases inertes es bastante deseable, ya que se cree que alcanzan el sobreexceso requerido en el proceso de esterilización [como un nivel de garantía de esterilidad (SAL) de al menos 10⁻⁶] en paralelo con la compatibilidad de materiales y funcionalidad. Este es un equilibrio importante de lograr para la validación de la esterilización en aplicaciones médicas y de fabricación. Las aplicaciones de plasma de gas inerte son el foco de investigaciones, patentes y discusiones adicionales en todo el mundo.

Especies Activas para la Esterilización mediante Plasma de Gas

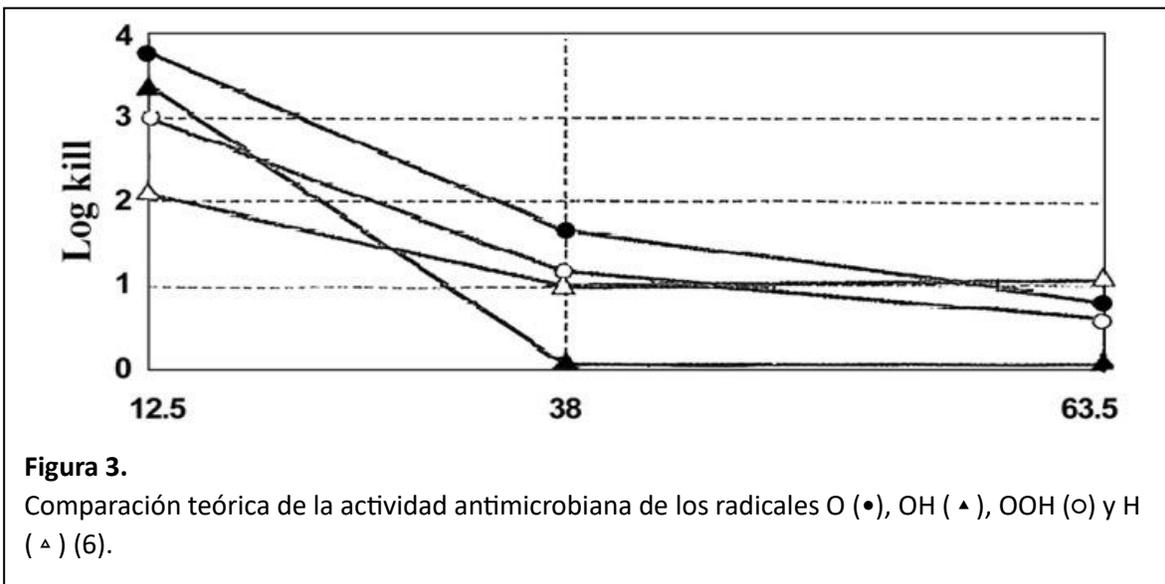
Diversos tipos de especies activas se consideran responsables de los efectos antimicrobianos del plasma de gas. Estas incluyen diversos tipos de iones, electrones, radicales, luz UV, UV en el vacío (VUV), campos eléctricos y metastables (véase Figuras 1 y 2) (<http://www.astp.com/plasma-equipment/applications>). Es importante destacar que estas especies activas pueden variar según los tipos de gases utilizados para la formación del plasma y los métodos empleados para generar

el plasma. A continuación, se profundiza en estos aspectos, basándose en los diferentes tipos de gases comúnmente utilizados.

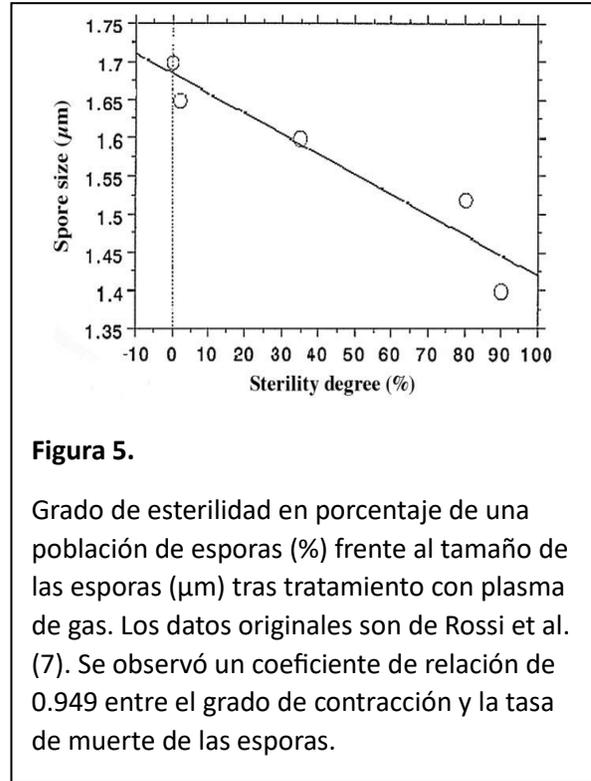
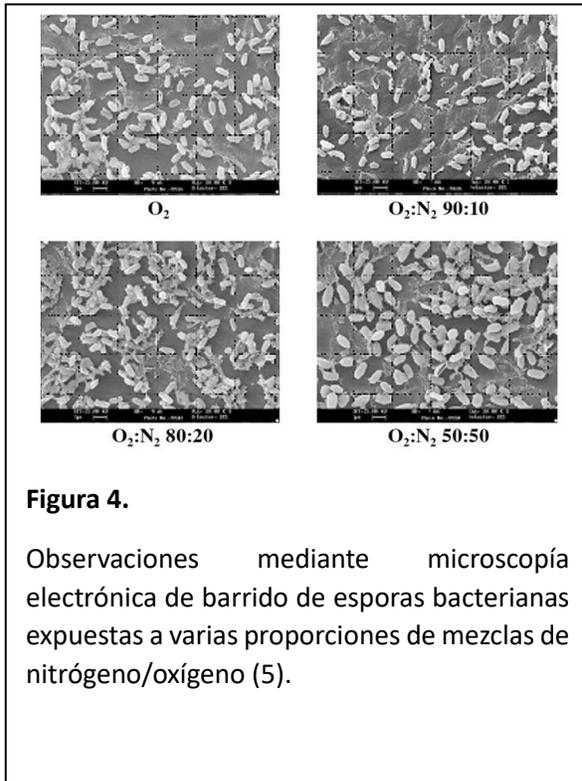


Oxígeno

El gas más popular investigado hasta la fecha para la esterilización por plasma es el oxígeno (O₂). El O₂ produce átomos de oxígeno (O), radicales hidroxilos (OH), peróxido de hidrógeno (OOH) y una mezcla de otros radicales que contribuyen a los efectos de esterilización (6). Entre estos, el radical OH a menudo se considera el más eficiente para la inactivación microbiana, a pesar de su vida extremadamente corta (6) (véase Figura 3).



Se cree que el mecanismo de diversos radicales de O_2 se debe a los efectos de grabado (véase Figura 2). Basado en la visualización directa de esporas bacterianas expuestas, se observa que a mayor exposición al plasma de O_2 , mayor es la contracción de las esporas (véase Figura 4) (5). Existe una relación significativa entre el grado de contracción y la muerte de las esporas (véase Figura 5) (7); el coeficiente de correlación de la línea de regresión, como se muestra en la Figura 5, es de 0.949. En contraste, el plasma de N_2 no presenta ninguna contracción (7,8). La diferencia en los mecanismos de los gases O_2 y N_2 aún no se ha aclarado completamente y debe considerarse seriamente desde el punto de vista antimicrobiano y de compatibilidad.



Nitrógeno

Como lo demostraron Rossi et al. (7,8), al generar plasma de gas N_2 , las especies activas no tuvieron la capacidad de contraer las esporas bacterianas o la tuvieron de manera insuficiente, sugiriendo un mecanismo de acción diferente al que ocurre con el oxígeno. Actualmente, no existen teorías específicas sobre por qué esto ocurre, pero puede deberse a la dificultad de ionizar el N_2 . Químicamente, el N_2 es una molécula con un enlace triple, por lo que la energía de disociación es alta, aproximadamente 9.91 eV (1), lo que sugiere que es resistente a la ionización (Tabla I). A partir de esto, se puede especular que los iones N^+ o $N\cdot$ son difíciles de alcanzar en comparación con el oxígeno. Sin embargo, no se sabe qué especies activas están presentes para causar los efectos de esterilización observados con plasmas de gas N_2 . Puede estar presente UV-C (254 nm) (véase Figura 6) (http://www.phys.ksu.edu/gene/f_5.html), pero en cantidades consideradas bajas (1); el VUV (<200 nm) también puede estar presente, aunque esto aún no se ha confirmado de manera definitiva.

Tabla I.

Energía de disociación de varios tipos de gases

Gas	Energía de disociación (eV)
N ₂	9.91
O ₂	5.21
H ₂ O	5.11
NO	6.50
SO ₂	5.60
N ₂ O	4.93
CO ₂	5.52
O ₃	1.05
H ₂ O ₂	2.21

Si consideramos los efectos observados con procesos de plasma pulsado (1), los efectos directos o contributivos del voltaje pulsado pueden llevar a cambios estructurales directos en las esporas, donde se observan muchas grietas en el análisis microscópico (1) (véase Figura 7). En general, es difícil evaluar si estos factores físicos contribuyen significativamente a estos efectos, y se necesita más investigación para dilucidar los verdaderos efectos antimicrobianos y las especies activas involucradas en los plasmas de gas N₂.

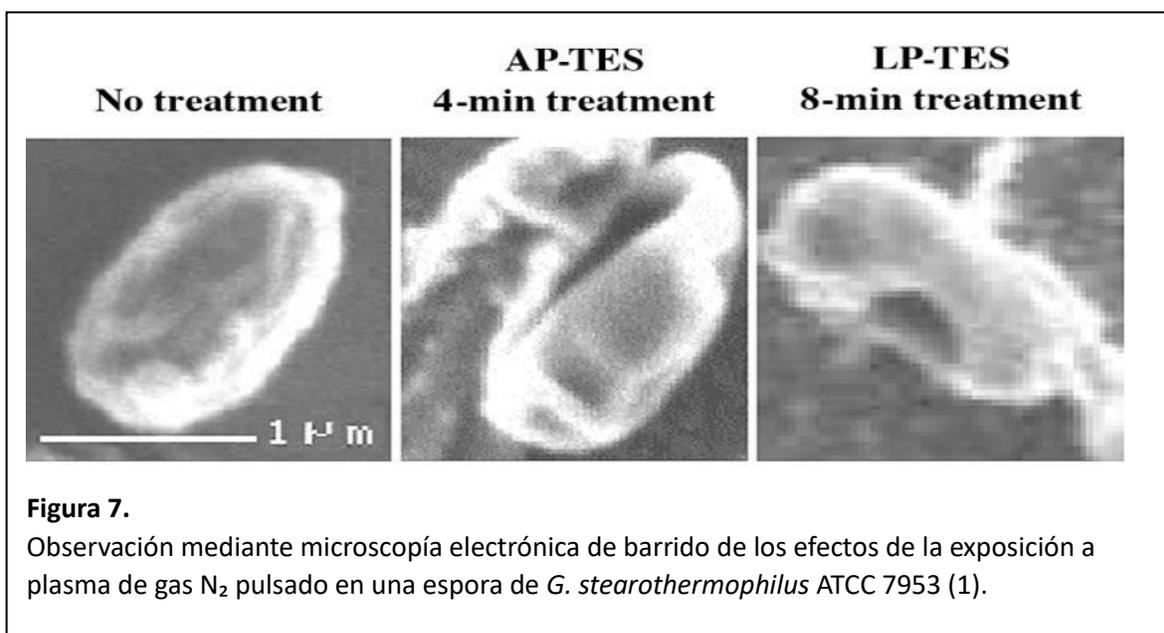


Figura 7.

Observación mediante microscopía electrónica de barrido de los efectos de la exposición a plasma de gas N₂ pulsado en una espora de *G. stearothermophilus* ATCC 7953 (1).

Profundidad de penetración de especies activas en plasmas de gas O₂ y N₂

La profundidad de penetración de las especies activas (iones y radicales; véanse Figuras 1 y 2) en el caso del gas N₂ parece ser aproximadamente de 10 a 40 nm desde la superficie de las esporas, según lo observado mediante microscopía de fuerza atómica (véase Figura 8) (1).

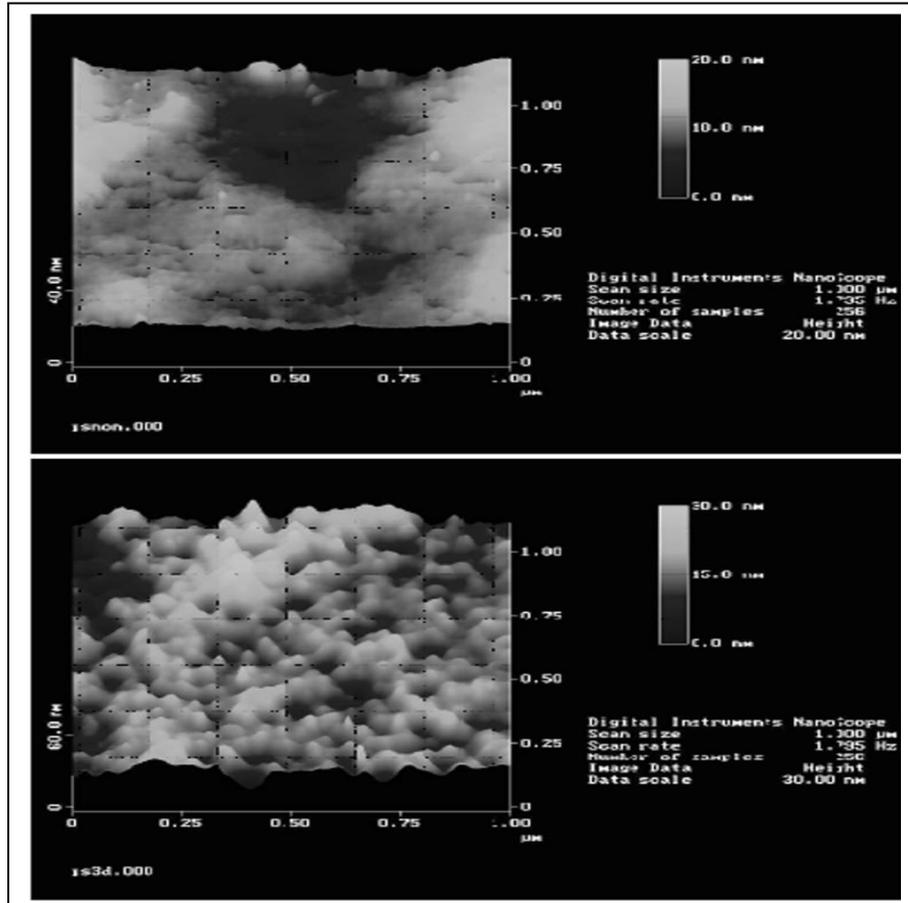


Figura 8.

Grabado de una superficie de poliestireno por plasma de gas nitrógeno observado con microscopía de fuerza atómica (1). Panel superior, después de 7 minutos de tratamiento; panel inferior, control.

La Figura 8 muestra el efecto de la exposición al plasma de gas N₂ en contraste con la exposición al plasma de gas O₂, que parece tener una capacidad de penetración algo más profunda y efectos más extensos en las esporas bacterianas (7,8). Dado que la escala de una estructura de spora típica es de 1,000 × 3,000 nm, se predijo que la profundidad de penetración del plasma de gas O₂ es <1,000 nm. Esto sugiere que penetra diez veces más profundo que el plasma de gas N₂.

Gases raros o nobles, como helio, neón, argón y xenón

También se ha estudiado el plasma generado a partir de otros gases raros o nobles, como helio (He), neón (Ne), argón (Ar) y xenón (Xe) (8-13). En un informe (8) que presentó un caso para el uso de Ar, los efectos directos de Ar en las esporas expuestas fueron similares a los observados con el plasma de gas N₂. Resultados similares se observaron con el plasma de gas He, como se muestra en las Figuras 9 y 10 (9).

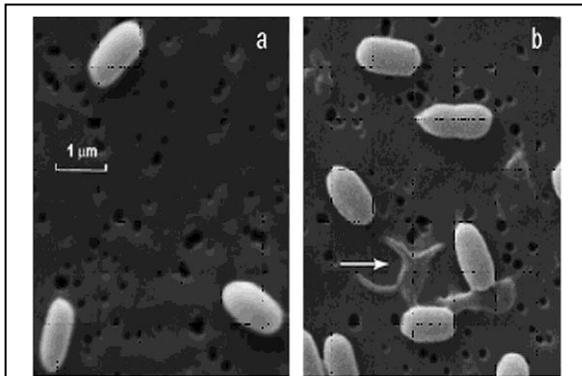


Figura 9.

Imágenes mediante microscopía electrónica de barrido de las esporas de *B. atrophaeus* ATCC 9372: (a) antes del tratamiento con plasma de He y (b) después del tratamiento con plasma de He durante 5 minutos.

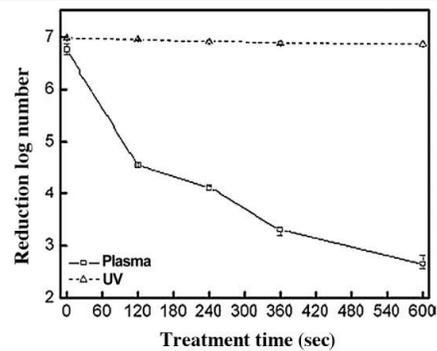


Figura 10.

Curvas de supervivencia de la población de esporas para la esterilización con plasma de gas He (□) en comparación con UV (△) (9). En este experimento, el UV-C tuvo efectos mínimos o nulos en la esterilización bajo las condiciones de exposición descritas.

Dado que los gases raros son bastante difíciles de ionizar, es poco probable que los diversos iones, electrones, radicales o incluso UV contribuyan de manera significativa como especies activas en las exposiciones de esterilización por plasma de gas (9). Además, una comparación directa con UV por sí solo no mostró efectos esporocidas (véase Figura 10) (9).

Se deben considerar los efectos del VUV (14-16), y de hecho, se está llevando a cabo una investigación relevante sobre los efectos de la exposición al VUV (a una emisión de 174 nm utilizando un aparato UV Ekishima de Iwasaki Electronic Co. Ltd., Japón) (14).

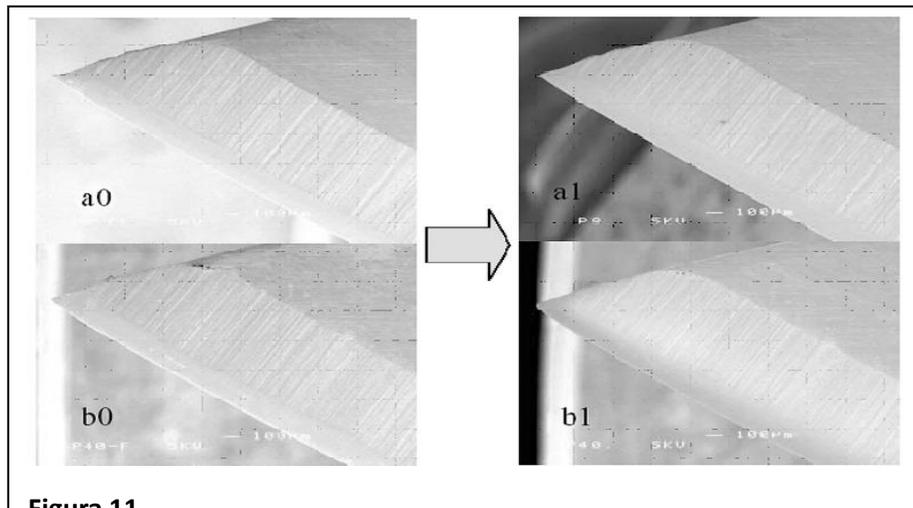
En general, durante la exposición al plasma de gas O₂, no es difícil proponer y definir las especies activas presentes y responsables de la actividad observada. Sin embargo, las especies activas presentes en plasmas de N₂ y gases raros son más difíciles de precisar y dilucidar. Parece que los plasmas de gas O₂ probados hasta la fecha pueden tener una desventaja significativa en términos de deterioro de materiales debido a un fenómeno de grabado. En contraste, los gases inertes como el N₂ o los gases raros inactivan las esporas mediante un mecanismo diferente, y por lo tanto, son más deseables ya que pueden cumplir tanto con los requisitos de eficacia del SAL (Sterility Assurance Level) como con la compatibilidad de materiales y funcionalidad requeridas para los procesos de esterilización validados. Por lo tanto, estos podrían resultar ser alternativas útiles a los

métodos tradicionales de esterilización, como el gas de óxido de etileno humidificado, rayos γ , haz de electrones, esterilización por vapor y calor seco.

Usos actuales del plasma para la descontaminación

La descontaminación es un término general que puede definirse como cualquier medio físico y/o químico para hacer que una superficie, instrumento, tejido, líquido, aire o cualquier otro objeto sea seguro para su manipulación, uso o eliminación (17). Un ejemplo típico de limpieza por plasma de gas se muestra en la Figura 11 (1). El término 'seguro' en descontaminación se refiere a la reducción o eliminación/inactivación completa de microorganismos que podrían causar infecciones u otras complicaciones si se introdujeran inadvertidamente en un individuo. Esto incluye numerosos tipos de aplicaciones de limpieza, desinfección y esterilización ampliamente utilizadas en diversas prácticas médicas, dentales, agrícolas, veterinarias, industriales y manufactureras.

Varias formas de plasma pueden tener un uso potencial en estas aplicaciones. Actualmente, se utilizan una variedad de métodos (17). Estos incluyen métodos físicos, como fuentes de calor y radiación, así como una gama de productos químicos, incluyendo peróxido de hidrógeno, glutaraldehído y alcoholes. Los plasmas se consideran físico-químicos, ya que incluyen un gas que por sí mismo puede tener algunos efectos antimicrobianos, pero también son una fuente física de energía.



Hasta la fecha, las aplicaciones de descontaminación por plasma han estado limitadas a algunos usos industriales y no se han adoptado ampliamente. Actualmente, no existen procesos comerciales verdaderamente desarrollados basados en plasma, a pesar de muchas investigaciones y patentes emitidas desde la década de 1970 sobre varios tipos de aplicaciones de desinfección,

esterilización e incluso limpieza. A pesar de la considerable investigación, los únicos procesos que se han utilizado extensamente no involucran plasmas 'auténticos'. En tales procesos, se utilizan varios tipos de oxidantes gaseosos, como el peróxido de hidrógeno, el ácido peracético y el ozono, para generar plasmas, pero la forma de plasma no se utiliza con fines antimicrobianos. En el caso de los esterilizadores de plasma de gas de peróxido de hidrógeno ampliamente utilizados (sistemas STERRAD®), las condiciones del ciclo muestran claramente que el plasma solo se genera después de la exposición y eliminación del gas (por vacío) (2) y tiene poco efecto antimicrobiano. Sin embargo, en estos procesos, el plasma es importante ya que ayuda a eliminar los residuos de peróxido (gas y líquido) de la carga del esterilizador para hacer que el contenido sea seguro para su manejo y uso. De manera similar, hasta la fecha, los productos que afirman usar plasma para 'activar' agua u otros líquidos y para descontaminación simplemente usan plasma como una forma alternativa de energía para activar los diversos químicos ya presentes en (o añadidos a) el agua. Ejemplos incluyen la adición de NaCl al agua, que activa el agua para producir cloro libre activo o ácido hipocloroso. De hecho, en algunas investigaciones se ha demostrado claramente que el mecanismo de acción es el cloro en lugar de cualquier efecto directo de plasma (18).

Un área de investigación particularmente activa en los últimos 5-10 años ha sido la elucidación y optimización de los diversos tipos y aplicaciones de procesos antimicrobianos basados en plasma auténtico. Las aplicaciones potenciales han incluido, como un proceso óptimo de limpieza, limpieza-desinfección combinada, desinfección terminal y procesos de esterilización. Además de las aplicaciones industriales, estos pueden tener usos médicos, como en dispositivos, combinaciones de medicamentos y dispositivos, tejidos y sistemas de manejo de aire/agua.

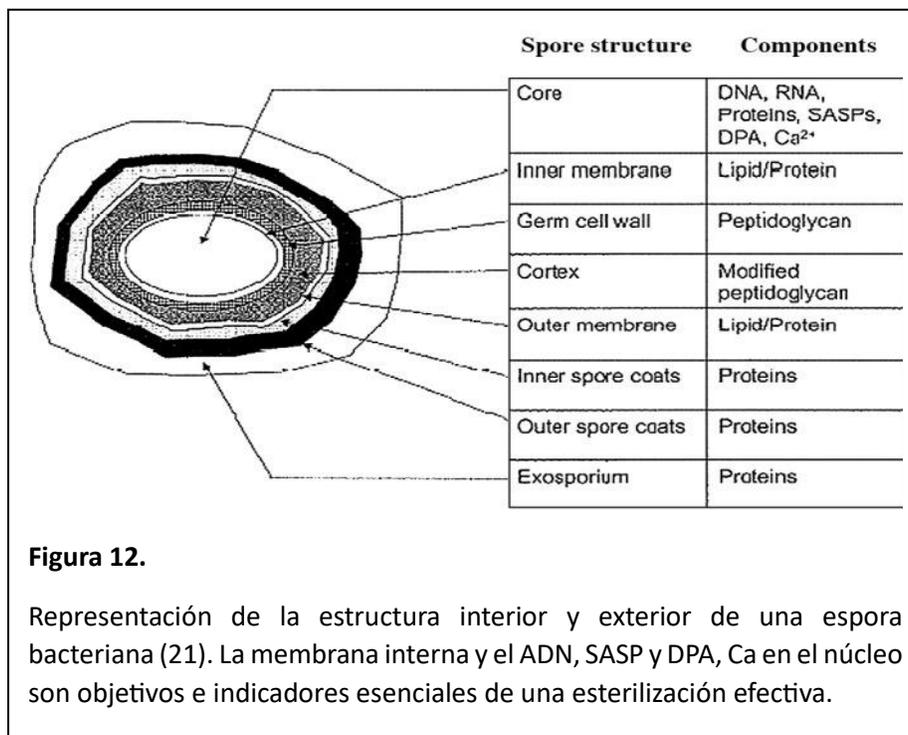
Una vez que se desarrollen procesos efectivos para aplicar la tecnología de plasma de manera segura, efectiva y práctica, se puede lograr el éxito comercial (19). La tecnología de plasma tiene muchas ventajas, como una actividad antimicrobiana de amplio espectro (incluidos efectos contra biomoléculas problemáticas, como priones y endotoxinas), facilidad de generación y perfiles de seguridad ambiental en comparación con otras tecnologías basadas en calor y productos químicos.

Mecanismo especulado de la acción del plasma de gas

Los mecanismos de acción del plasma de gas claramente representan un área que requiere más investigación. Se ha sugerido que están relacionados con diversos efectos de oxidación y reducción en las macromoléculas que constituyen las estructuras microbianas (como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) (20). Hasta la fecha, no se han publicado estudios que demuestren o aclaren directamente los mecanismos definitivos del plasma de gas. Además, como se menciona en esta revisión, se han reportado diferencias en los mecanismos de acción entre los plasmas basados en oxígeno en comparación con otros gases inertes, como N₂, He y Ar.

La Figura 12 muestra una representación de la estructura externa e interna de una endospora bacteriana (20). Aunque estas estructuras varían según la especie bacteriana y las condiciones de crecimiento, es una representación útil para el propósito de esta discusión. Las membranas internas de la espora son estructuras bastante rígidas, por las que solo las moléculas <200 daltones pueden pasar. Estas membranas son importantes ya que contienen receptores para varios germinantes que promueven la germinación y el crecimiento de la espora. A pesar de su importancia, si la membrana

interna se daña, el ácido dipicolínico (DPA) se filtra (como un claro indicador tanto del daño estructural de la espora como de la germinación inicial), y la germinación no se promueve posteriormente (21,22). El acceso a estas membranas está limitado debido a las diversas capas externas de la espora, que requieren un daño o penetración adicional para acceder a las membranas internas. El núcleo interno de la espora en sí consiste en varios mecanismos de protección, incluyendo las pequeñas proteínas solubles en ácido que están estrechamente asociadas con el ADN y lo protegen de ataques físicos o químicos. Por lo tanto, el daño al ADN también es un factor importante a considerar. Los gases inertes son inactivos, pero se espera que las moléculas y radicales excitados de gas inerte (gas metastable) sean capaces de penetrar en el interior de la espora, sin interferir con las proteínas y lípidos cargados que rodean la membrana y el núcleo internos. Las moléculas y radicales excitados pueden, por lo tanto, atacar y atravesar la membrana interna para atacar el ADN en el núcleo. En ese sentido, cationes, aniones, electrones, fotones o UV-C (véanse Figuras 1 y 2) no se especulan como candidatos para atacar el interior de la espora. Si la membrana interna está dañada o no, se puede aclarar mediante observación utilizando un microscopio de contraste de fase o microscopía electrónica de barrido (23), y la liberación de DPA se determina en el medio de cultivo del área circundante de la espora. Se discutirán más experimentos en detalle en otro lugar (24).



Por el contrario, como se ha propuesto con otros plasmas de gas, los efectos esporicidas se observan predominantemente en la superficie de la espora, llevando a un grabado. Estos efectos pueden inicialmente causar daños en la superficie de la espora (mediante reacciones de oxidación-reducción), pero luego las proteínas afectadas y otras macromoléculas se entrecruzan entre sí, lo que lleva a la pérdida de viabilidad de la espora. Diferencias similares en eficacia se han reportado

para otros agentes esporicidas, incluso si utilizan el mismo biocida. Por ejemplo, en el caso del peróxido de hidrógeno, los mecanismos de acción del peróxido de hidrógeno en su forma gaseosa verdadera parecen ser diferentes de los de su forma líquida o condensada (18,19). La forma gaseosa parece atacar principalmente los enlaces peptídicos de las proteínas, llevando a la degradación de las proteínas; por el contrario, la forma líquida preferentemente oxida las cadenas laterales de aminoácidos de las mismas proteínas, lo que parece resultar en el entrecruzamiento y agrupamiento de proteínas. Estos efectos se complican aún más en la presencia de otras químicas (inertes), como es común cuando se utiliza peróxido de hidrógeno, y también se ha informado sobre otros agentes oxidantes.

En general, los verdaderos mecanismos de acción de la mayoría de los biocidas contra las esporas bacterianas no están bien descritos en la literatura, mientras que un área para la investigación futura debería incluir el estudio de estos mecanismos con varios plasmas. Los experimentos que investigan los efectos directos del plasma en las macromoléculas que componen las estructuras microbianas pueden ser una manera inicial y significativa de mejorar la comprensión de estos efectos en condiciones controladas.

Pruebas esporicidas y la importancia del agrupamiento de esporas

Casi todos los estudios que investigan la cinética de la actividad esporicida con plasmas publicados hasta la fecha presentan el mismo fenómeno de cola en las curvas de supervivencia (9,25). La estructura de estas curvas de supervivencia es una consideración importante para diferenciar un proceso de desinfección de un proceso de esterilización, y particularmente para permitir la extrapolación de los niveles de garantía de esterilidad (SAL). La cola en las curvas de supervivencia del plasma se muestra mediante una relación lineal inicial entre la reducción logarítmica de las poblaciones de esporas con el tiempo, seguida de una relación no lineal en la región cuántica de la curva de eliminación (Fig. 10). Esto impediría la extrapolación de un SAL de 10^{-6} en una población inicial de 10^6 UFC requerida para un proceso de esterilización de sobreexposición. Esto puede interpretarse como una limitación en el proceso antimicrobiano en prueba y/o un artefacto del método de prueba. La causa más común de artefactos es el agrupamiento de las preparaciones de esporas utilizadas para las pruebas (7).

El organismo más reconocido como resistente para la esterilización por vapor, gas de peróxido de hidrógeno, plasma de gas de peróxido y potencialmente otros plasmas (hasta la fecha) son las endosporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 o 12980. Durante las investigaciones de esterilización, las suspensiones de esporas de *G. stearothermophilus* con una población de 10^6 UFC se inoculan en materiales portadores adecuados, como acero inoxidable o poliestireno. Estos están disponibles comercialmente como indicadores biológicos (IBs) (Figuras 13 y 14). En los experimentos de plasma, los IBs de un fabricante (A) demostraron un fenómeno de cola reproducible, que se asumió se debía al agrupamiento (debido a que las esporas estaban presentes en múltiples capas; Fig. 13). Por el contrario, la curva de supervivencia observada por otro fabricante (B) (Fig. 14) utilizando el mismo proceso de plasma presentó una relación lineal reproducible (Fig. 15), permitiendo la extrapolación de un SAL. El valor D (el tiempo promedio para obtener una reducción logarítmica del microorganismo de prueba) calculado a partir de la Figura 15 fue de aproximadamente 1 minuto. Por lo tanto, un tiempo mínimo de esterilización de 12 minutos para

el método de sobreexposición bajo estas condiciones de exposición proporcionaría un SAL de 10^{-6} , según los estándares internacionales para procesos de esterilización (ISO 14937) (3). La correlación entre la reducción logarítmica del microorganismo de prueba y el tiempo de exposición fue de 0.992 (Figura 15). Esta relación es bastante satisfactoria para la extrapolación de un SAL.

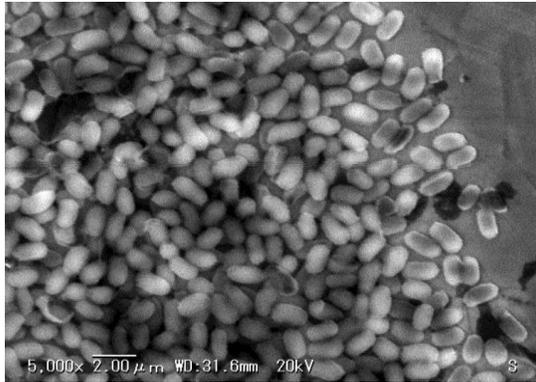


Figura 13.

Microscopía electrónica de barrido utilizando un indicador biológico de la empresa A.

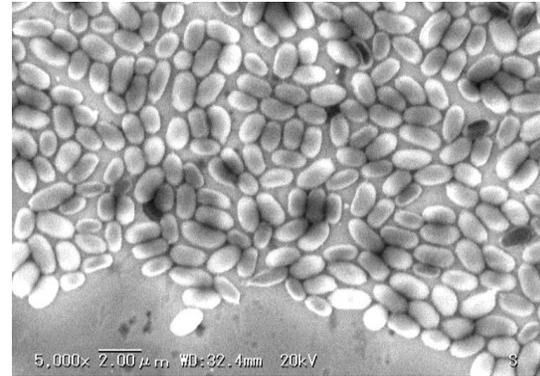


Figura 14.

Microscopía electrónica de barrido utilizando un indicador biológico de la empresa B.

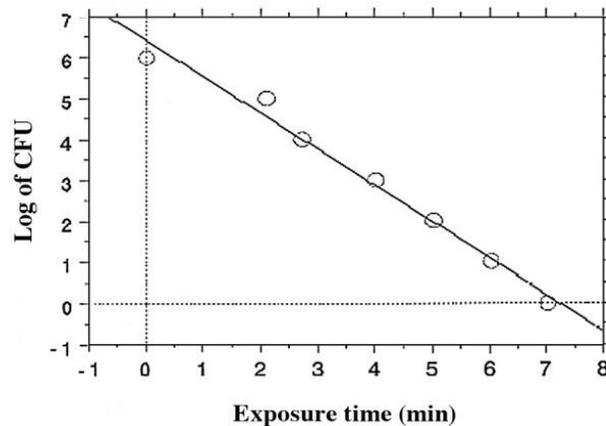


Figura 15.

Curva de supervivencia de la esterilización por plasma utilizando el indicador biológico de la empresa B, presentado en la Figura 14. El valor D fue de aproximadamente 1 minuto y no se observó el fenómeno de cola de manera reproducible debido a la falta de agrupamiento

El método de sobreexposición para demostrar un proceso de esterilización es el más ampliamente utilizado, pero no es el único. La esterilización también se demuestra mediante la comprensión de

la carga biológica natural (números y tipos de microorganismos viables) presentes en el producto a esterilizar; este es, de hecho, el objetivo real de la esterilización. Cuando la carga biológica es baja, el desafío de la esterilización no es grande, pero cuando es alta y está asociada con un agrupamiento significativo (como se observa con virus y varios tipos de bacterias, incluida la presencia de biofilm) (26), esto representa un desafío significativo para el proceso de esterilización. Sin embargo, en muchos casos, estas células bacterianas vegetativas (27) y otros microorganismos son generalmente mucho menos resistentes a los plasmas de gas (20) (Fig. 16). Por lo tanto, la capacidad de penetración del plasma de gas, como se discutió previamente, debería ser suficiente para penetrar y esterilizar cualquier carga biológica presente y, al mismo tiempo, alcanzar un SAL adecuado de 10^{-6} junto con compatibilidad material y funcional. Esto debe demostrarse para cualquier proceso potencial de esterilización por plasma.

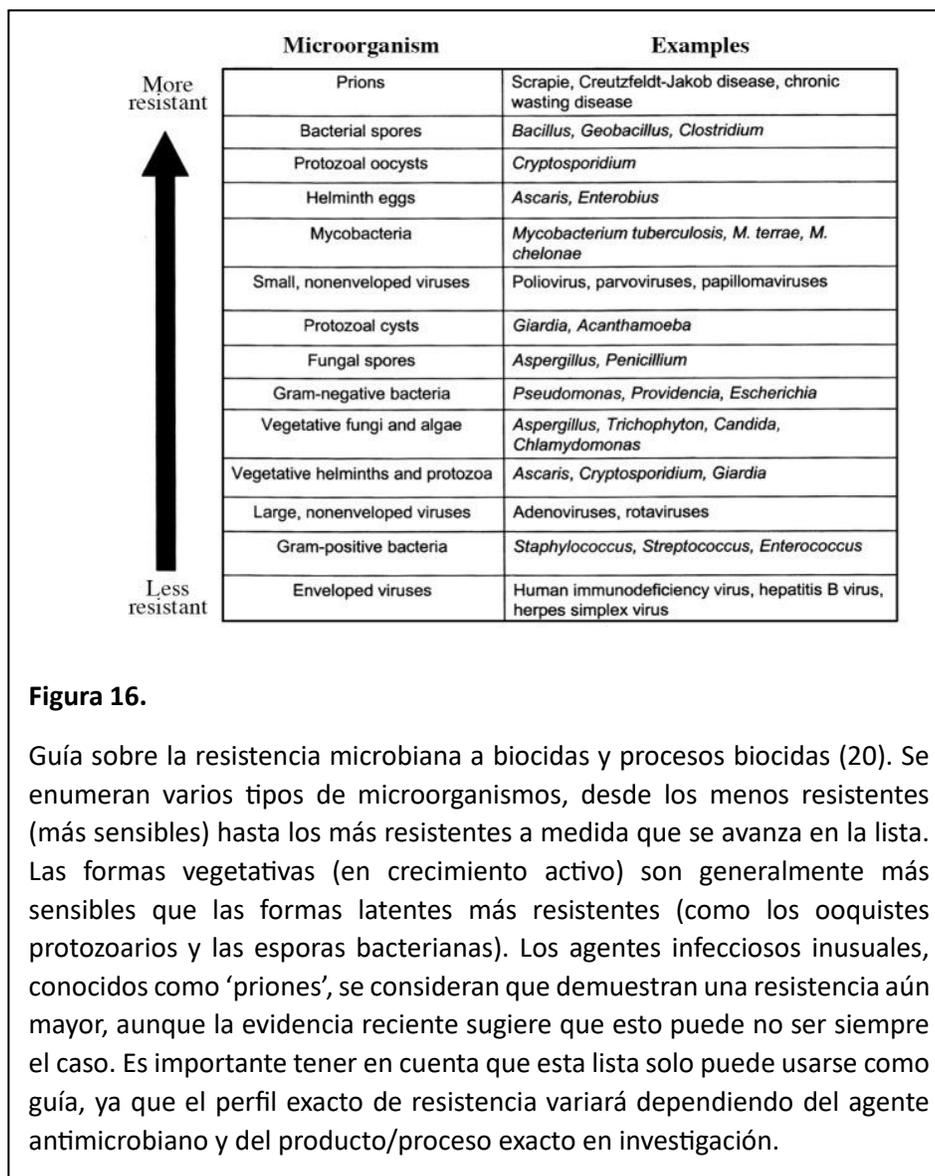


Figura 16.

Guía sobre la resistencia microbiana a biocidas y procesos biocidas (20). Se enumeran varios tipos de microorganismos, desde los menos resistentes (más sensibles) hasta los más resistentes a medida que se avanza en la lista. Las formas vegetativas (en crecimiento activo) son generalmente más sensibles que las formas latentes más resistentes (como los ooquistes protozoarios y las esporas bacterianas). Los agentes infecciosos inusuales, conocidos como 'priones', se consideran que demuestran una resistencia aún mayor, aunque la evidencia reciente sugiere que esto puede no ser siempre el caso. Es importante tener en cuenta que esta lista solo puede usarse como guía, ya que el perfil exacto de resistencia variará dependiendo del agente antimicrobiano y del producto/proceso exacto en investigación.

Perspectivas para el futuro

Es probable que los métodos de desinfección y/o esterilización por plasma de gas puedan desarrollarse para proporcionar la reducción antimicrobiana requerida (según un SAL apropiado, por ejemplo, 10^{-6} para la esterilización) y compatibilidad material/funcional. El plasma puede tener aplicaciones importantes en entornos médicos e industriales. En este sentido, las perspectivas sobre los métodos de esterilización por plasma requieren una mayor investigación. Para aclarar los mecanismos y optimizar el desarrollo de la esterilización por plasma de gas, la colaboración estrecha entre microbiólogos y químicos físicos ofrecerá la mejor oportunidad para el éxito futuro de esta tecnología.

Referencias

1. Shintani H, Shimizu N, Imanishi Y, Sekiya T, Tamazawa K, Taniguchi A, Kido N. Inactivación de microorganismos y endotoxinas por exposición a plasma de nitrógeno a baja temperatura. *Biocontrol Sci.* 2007;12:131-143. [PubMed] [Google Scholar]
2. Krebs MC, Becasse P, Verjat D, et al. Esterilización con plasma de gas: eficiencia relativa de la fase de peróxido de hidrógeno en comparación con la fase de plasma. *Int J Pharm.* 1988;160:75-81. [Google Scholar]
3. ISO 14937. Esterilización de productos para la salud. 2009. Requisitos generales para la caracterización de un agente esterilizante y el desarrollo, validación y control rutinario de un proceso de esterilización para dispositivos médicos.
4. Sato N. Enfoque básico para la producción y control del plasma. En: D'Agostino R, Favia P, Kawai Y, Ikegami H, Sato N, Arefi-Khonsari F, editores. *Advanced Plasma Technology*. Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co; Weinheim, Alemania: 2008. pp. 1-16. [Google Scholar]
5. Kylian O, Sasaki T, Rossi F. Esterilización de *Geobacillus stearothermophilus* por plasma RF inductivamente acoplado O₂ *Eur Phys J Appl Phys.* 2006;34:139-142. [Google Scholar]
6. Jacobs PT, Lin S-M. Procesos de esterilización utilizando plasmas a baja temperatura. En: Block SS, editor. *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Lippincott Williams & Wilkins; Nueva York: 2001. pp. 747-765. [Google Scholar]
7. Rossi F, Kylian O, Hasiwa M. Mecanismos de esterilización y descontaminación de superficies por plasma a baja presión. En: D'Agostino R, Favia P, Kawai Y, Ikegami H, Sato N, Arefi-Khonsari F, editores. *Advanced Plasma Technology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; Weinheim, Alemania: 2008. pp. 319-340. [Google Scholar]
8. Rossi F, Kylian O, Hasiwa M. Descontaminación de superficies por descargas de plasma a baja presión. *Plasma Process Polym.* 2006;3:431-442. [Google Scholar]
9. Deng X, Shi J, Kong MG. Mecanismos físicos de inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* utilizando plasmas fríos atmosféricos. *IEEE Trans Plasma Sci.* 2006;34:1310-1316. [Google Scholar]

10. Kim S-M, Kim J-I. Descomposición de macromoléculas biológicas por plasma generado con helio y oxígeno. *J Microbiol.* 2006;44:466-471. [PubMed] [Google Scholar]
11. Lee K, Paek K-H, Ju W-T, Lee Y. Esterilización de bacterias, levaduras y esporas bacterianas por plasma frío a presión atmosférica utilizando helio y oxígeno. *J Microbiol.* 2006;44:269-275. [PubMed] [Google Scholar]
12. Yu QS, Huang C, Hsieh F-H, Huff H, Duan Y. Inactivación bacteriana utilizando un cepillo de plasma atmosférico de baja temperatura mantenido con gas argón. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater.* 2007;80B:211-219. [PubMed] [Google Scholar]
13. Purevdorj D, Igura N, Ariyada O, Hayakawa I. Efecto de la composición del gas de alimentación de plasmas de carga de gas sobre la mortalidad de esporas de *Bacillus pumillus*. *Lett Appl Microbiol.* 2003;37:31-34. [PubMed] [Google Scholar]
14. Kinoshita S. Examinación del efecto de UV y VUV en esterilización. *Bohkin Bobai.* (En prensa)
15. Halfmann H, Bibinov N, Wunderlich J, Awakowicz P. Correlación entre la radiación VUV y la eficiencia de esterilización en un plasma de doble acoplamiento inductivo. Presentado en el 28° Congreso ICPIG; Praga. p. 2007. [Google Scholar]
16. Lerouge S, Fozza AC, Wertheimer MR, Marchand R, Yahia L. Esterilización por plasma a baja presión: el papel de la radiación ultravioleta al vacío. *Plasma Polymers.* 2000;5:31-46. [Google Scholar]
17. Güçeri S, Fridman A. Descontaminación asistida por plasma de agentes biológicos y químicos. Springer; Países Bajos: p. 2008. [Google Scholar]
18. McDonnell G. Peróxidos y otras formas de oxígeno: su uso para limpieza, desinfección y esterilización efectivas. En: Zhu PC, editor. *New Biocides Development: the Combined Approach of Chemistry and Microbiology.* Oxford University Press; Nueva York: 2006. pp. 292-308. [Google Scholar]
19. Finnegan M, Linley E, Denyer SP, McDonnell G, Simons C, Maillard J-Y. El modo de acción del peróxido de hidrógeno y otros agentes oxidantes: diferencias en forma líquida y gaseosa. *J Pharm Sci.* (En prensa) [PubMed] [Google Scholar]
20. McDonnell GE. Antisepsis, Desinfección y Esterilización. ASM Press; Washington DC: 2007. p. 33.p. 282. [Google Scholar]
21. Cortezzo DE, Koziol-Dube K, Setlow B, Setlow P. El tratamiento con agentes oxidantes daña la membrana interna de esporas de *Bacillus subtilis* y sensibiliza las esporas al estrés posterior. *J Appl Microbiol.* 2004;97:838-852. [PubMed] [Google Scholar]
22. Setlow P. Esporas de *Bacillus subtilis*: su resistencia y muerte por radiación, calor y productos químicos. *J Appl Microbiol.* 2006;101:514-525. [PubMed] [Google Scholar]

23. Imae Y, Strominger MB, Strominger J. Estudios con microscopio electrónico de mutantes de *Bacillus sphaericus* con córtex condicional. *J Bacteriol.* 1976;127:1568-1570. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
24. Shintani H, McDonnell G. Inactivación de microorganismos (tipo de espora y células vegetativas) y el mecanismo por plasma de gas. En: Sakudo A, Shintani H, editores. *Sterilization and Disinfection by Plasma: Sterilization Mechanism, Biological and Medical Applications.* NOVA Science Publishers; Nueva York: (En prensa) [Google Scholar]
25. Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH. Esterilización a baja temperatura utilizando plasmas de gas: una revisión de los experimentos y un análisis del mecanismo de inactivación. *Int J Pharm.* 2001;226:1-21. [PubMed] [Google Scholar]
26. Joaquin JC, Kwan C, Abramzon N, Vandervoort K, Breiles-Marino G. ¿Es el plasma de descarga de gas una nueva solución al viejo problema de la inactivación de biofilm? *Microbiology.* 2009;155:724-732. [PubMed] [Google Scholar]
27. Shintani H, Taniai E, Miki A, Kurosu S, Hayashi F. Comparación de la eficiencia de recolección de muestreador de aire microbiológico. *J Hosp Infect.* 2004;56:42-48. [PubMed] [Google Scholar]