

STERILIZZARE A VAPORE : SCIENZA, TECNOLOGIA, SICUREZZA e BUONE PRATICHE DI LABORATORIO.

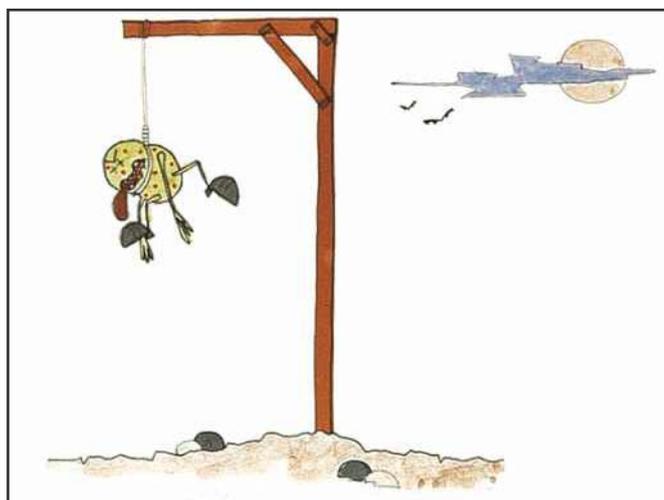
Il rischio biologico.

Il rischio derivante da esposizione ad agenti biologici ha costituito negli ultimi anni un fenomeno di interesse emergente a causa della comparsa di nuove modalità di infezione che si ritenevano sufficientemente controllate con le misure di prevenzione e terapeutiche disponibili.

Il D.Lgs 626/94 e quindi il DLgs 81/08 hanno fornito ampie indicazioni su criteri di classificazione degli agenti biologici, valutazione del rischio, misure tecniche, misure organizzative e procedurali generali applicabili a tutte le attività nelle quali vi è rischio di esposizione ad agenti biologici, sia quello con uso deliberato di microrganismi che quelle con potenziale esposizione; indicazioni specifiche sono state fornite per strutture sanitarie, veterinarie, laboratori, stabulari e processi industriali.

Obiettivo della sterilizzazione.

Obiettivo di qualsiasi processo di sterilizzazione è l'eliminazione o inattivazione di agenti biologici presenti in una preparazione o su un oggetto.



Alcuni microrganismi sono “cattivi” e quando creano problemi sono condannati a morte

I metodi di sterilizzazione a calore umido, tra i quali la sterilizzazione a vapore è il più usuale, sono considerati metodi di elezione per l'eliminazione o l'inattivazione di agenti biologici presenti in una preparazione o su un oggetto; ciò è dovuto al fatto che i fenomeni chimico-fisici che

sovrintendono il processo sono ben conosciuti e definiti ed i mezzi sterilizzanti (il vapore) sono economici e presentano pochi rischi.

Tutti gli altri metodi di sterilizzazione sono in generale più critici del calore umido perché più costosi, danneggiano maggiormente i materiali e sono più difficili da regolare, controllare e convalidare.

In tutti i documenti internazionali di riferimento per la sterilizzazione quali le Farmacopee, le Norme Tecniche, le Linee Guida prevalgono i metodi a calore umido.

Attività qualificata per un metodo universale.

La sterilizzazione a vapore è pertanto il metodo di sterilizzazione più usuale, salvo che problemi di incompatibilità del materiale con temperatura, umidità o pressione del vapore non rendano indispensabile l'adozione di un altro metodo.

Per sterilizzare si deve usare vapor d'acqua saturo e perché il processo di sterilizzazione sia efficace, il vapore deve giungere a contatto con i microrganismi da distruggere. Ciò è indispensabile perché è la combinazione temperatura+umidità che produce l'effetto sterilizzante del vapore. Lo strumento comunemente usato per la sterilizzazione a vapore è l'autoclave più propriamente definita sterilizzatrice.

Non solo in ambito farmaceutico, ma anche in ambito sanitario, nella produzione di dispositivi medici ed in laboratorio, “sterilizzare” non significa più “usare una sterilizzatrice” bensì è sinonimo di professionalità qualificata in grado di gestire processi conosciuti ma complessi che vanno quindi capiti e correttamente applicati in funzione delle specifiche situazioni.

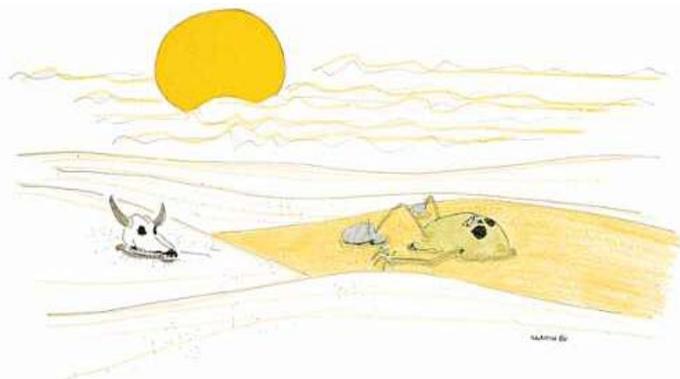
Per dirla con la Food and Drug Administration-USA, “...l'operatore di sterilizzazione deve essere in grado di rendersi costantemente conto di ciò che sta avvenendo dietro la porta chiusa della sua sterilizzatrice...”.

La sterilizzazione a vapore.

Come si è detto, l'azione sterilizzante si realizza attraverso il calore umido, in pratica il vapore, che è un'adeguata combinazione temperatura+umidità. Se si sviluppa soltanto la temperatura, si attua un processo di sterilizzazione a secco che richiede valori di temperatura molto più elevati (170-180°C). Decisivi quindi al fine del conseguimento dell'obiettivo "sterilizzazione" sono la produzione di vapore saturo ed il contatto con il microorganismo da inattivare.



- l'azione sterilizzante si realizza attraverso il calore umido, in pratica il vapore -



- Se si sviluppa soltanto la temperatura, si attua un processo di sterilizzazione a secco che richiede valori di temperatura molto più elevati (170-180°C) -

Il vapore può giungere o comunque prodursi a contatto dei microorganismi in modo diretto od indiretto.

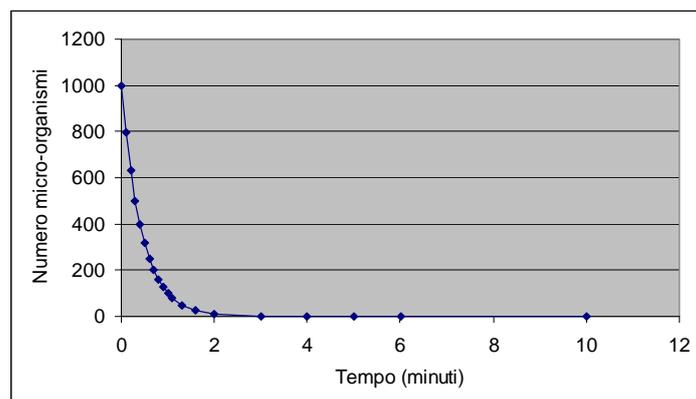
Un esempio del modo di contatto diretto è dato da un ferro chirurgico sterilizzato "libero" nella camera di sterilizzazione dell'autoclave oppure in confezionamento permeabile all'aria ed al vapore. Se il ferro chirurgico è invece contenuto in scatola stagna ad aria e vapore, la sterilizzazione a calore umido non avviene.

Un esempio di contatto indiretto è dato da una soluzione acquosa contenuta in flacone di vetro chiuso ermeticamente. Il vapore della autoclave sterilizza soltanto la parte esterna del flacone. Il volume di testa del flacone è sterilizzato da vapore che si genera dalla stessa soluzione che si "autosterilizza" arrivando alla temperatura di sterilizzazione. Se la soluzione è oleosa e perfettamente anidra, la sterilizzazione interna a calore umido non può avvenire perché manca l'umidità.

Scienza della sterilizzazione a vapore.

La sterilizzazione a vapore saturo procede con un andamento asintotico inverso: in ogni intervallo di tempo costante viene distrutta una percentuale costante dei microorganismi presenti all'inizio dell'intervallo stesso.

In sostanza un processo di sterilizzazione procede come una reazione chimica di 1° ordine.



Pertanto è soltanto con un processo di sterilizzazione di durata infinita che si può raggiungere la certezza assoluta che tutti i microorganismi siano stati inattivati.

Come vedremo più avanti, nelle attività farmaceutiche e biosanitarie si conviene di definire "sterile", in quanto sottoposto ad un adeguato processo di sterilizzazione, un oggetto o una preparazione quando si è in grado di certificare su basi statistiche che la probabilità che quell'oggetto o quella preparazione non risulti sterile è uguale od inferiore ad 1 su 1.000.000.

L'andamento di una reazione di sterilizzazione a calore umido è funzione della specie microbica presa in considerazione e della temperatura di sterilizzazione a calore umido e si esprime per mezzo del parametro "D".

D è il tempo espresso in minuti primi necessario per ottenere la riduzione ad un decimo (distruzione del 90%) dei microrganismi inizialmente presenti. La temperatura di riferimento abituale è 121 °C (più precisamente 121,11 °C che corrisponde a 250 °F della scala termometrica anglosassone).

In pratica, ammettendo che una determinata specie microbica abbia $D_{121}=1$ minuto, ciò significa che una popolazione di quella specie microbica sottoposta a sterilizzazione a calore umido a 121 °C per 1 minuto si riduce ad un decimo del valore iniziale. D viene definito quindi “tempo di decadimento decimale”.

Supponiamo di sterilizzare una fiala contenente la sospensione acquosa di spore di una determinata specie pura avente $D_{121}=1$ e costituita da una popolazione di 1000 (10^3) spore.

Dopo 1 minuto di trattamento a calore umido a 121°C tale popolazione si sarà ridotta ad 1/10 del valore iniziale, dopo un ulteriore minuto ad 1/100, e dopo un altro minuto ad 1/1000.

Quanto prima detto può essere più chiaramente esplicitato come segue:

$t_0=0$ min	1.000	microrganismi = 10^3
$t_1=1$ min	100	microrganismi = 10^2 a 121°C
$t_2=2$ min	10	microrganismi = 10^1 a 121°C
$t_3=3$ min	1	microrganismo = 10^0 a 121°C

Proseguendo la sterilizzazione per un ulteriore minuto, i microrganismi sopravvissuti risulterebbero 0.1, ovvero 1/10, ovvero 10^{-1} .

La sopravvivenza di un decimo di microrganismo non ha ovviamente un significato logico.

A questo punto si deve ragionare in termini probabilistici ed ammettere che la probabilità che la popolazione microbica iniziale non risulti completamente distrutta è di 1 contro 10.

Questo concetto probabilistico di preparazione/oggetto sterile in quanto “adeguatamente sterilizzato” viene espresso dal SAL ovvero “**Sterility Assurance Level**”.

Se si prosegue la nostra sterilizzazione della fiala per altri 5 minuti, la probabilità suddetta diventerà 1 contro 1.000.000 realizzando quindi un SAL di 10^{-6} .

Ovviamente, se si protrae la sterilizzazione per ulteriori 3 minuti si raggiungerà un SAL più rassicurante, pari a 10^{-9} .

Come affermato in precedenza, nelle attività farmaceutiche e biosanitarie si conviene di definire “sterile”, in quanto sottoposto ad un adeguato

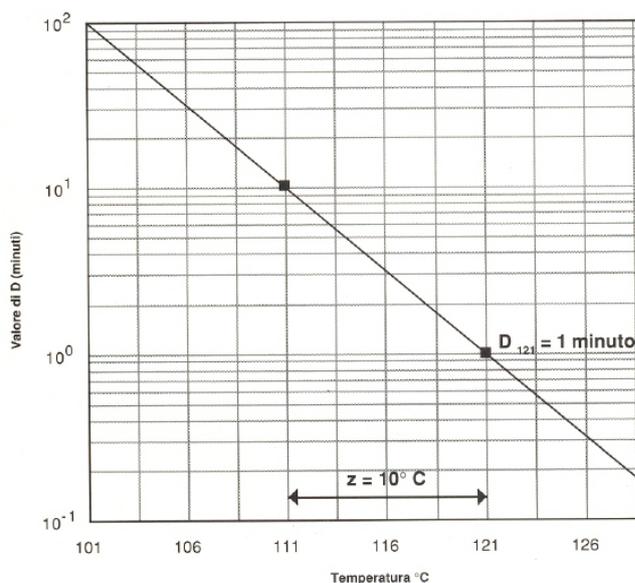
processo di sterilizzazione, un oggetto o una preparazione quando si è in grado di certificare il loro SAL sia uguale o più rassicurante di 10^{-6} ovvero di 1/1.000.000.

La variabile temperatura.

Il valore di “D” diminuisce con l’aumentare della temperatura di sterilizzazione e viceversa.

La variazione di D in base alla temperatura è definita dal parametro “z” detto “coefficiente di temperatura”. “z” indica il numero di volte di cui varia “D” al variare della temperatura di sterilizzazione di 10 °C.

“z” è funzione della specie microbica considerata e della temperatura. Il valore di “z” nei dintorni di 121 °C è assai elevato: mediamente si può ammettere che sia 10. Ciò significa che se un certo effetto sterilizzante viene ottenuto in 12 minuti a 121 °C, occorreranno solo 1,2 minuti per ottenere il medesimo effetto se la sterilizzazione avviene a 131 °C, ma occorreranno 120 minuti se avviene a 111 °C.



In conclusione la velocità di sterilizzazione a calore umido, e quindi il parametro “D”, sono influenzati in modo drammatico dalle variazioni anche casuali della temperatura di sterilizzazione e questo aspetto determina importanza e criticità della uniformità ed accuratezza della determinazione della temperatura sul carico da sterilizzare.

Di fatto, la variazione soltanto di 1 °C della temperatura di sterilizzazione a calore umido nei dintorni di 121°C provoca una variazione del 25 % circa del valore di “D”.

Per i microrganismi con i quali si ha abitualmente a che fare, “D” ha un valore che varia tra 0.05 e 1.0 minuti a 121 °C. Soltanto certi particolari microrganismi (ad esempio il *B. stearothermophilus*) hanno valori superiori. Analogamente il valore di “z” varia tra 5 e 15 (tra 110 e 130 °C) a seconda della specie microbica considerata.

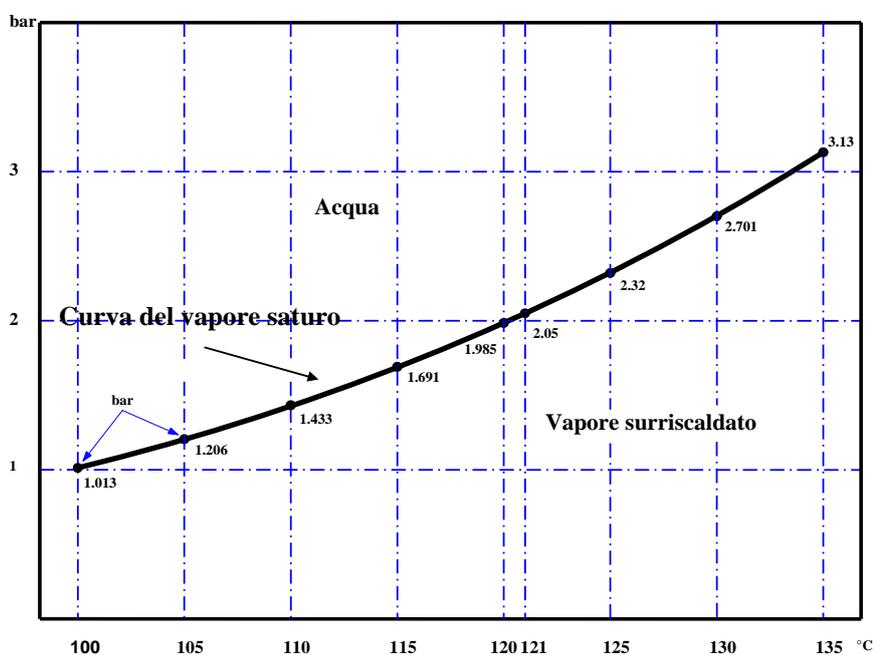
In mancanza di dati certi sulla specie microbica da trattare (o su quella più resistente nel caso abituale di contaminazione eterogenea), si assume per “D” il valore 1 e per “z” il valore 10.

Questa combinazione offre infatti ampi margini di sicurezza nella determinazione del SAL.

La variabile vapore saturo.

L’agente di sterilizzazione a calore umido più comune è il vapore d’acqua. Per sterilizzare si deve usare vapor d’acqua saturo. Un vapore è saturo quando è in equilibrio con il proprio liquido alla temperatura che si considera; nella rappresentazione grafica temperatura / pressione dell’acqua, il vapor saturo è rappresentato da una linea (leggermente curva) che definisce una corrispondenza biunivoca temperatura – pressione.

Se si sceglie la temperatura del vapor saturo, la sua pressione è automaticamente determinata e viceversa. Ad esempio, per la temperatura di 121 °C corrisponde la pressione di 2.05 bar assoluti mentre alla pressione di 3.04 bar corrisponde la temperatura di 134 °C.



E’ intuitivo come sia di fondamentale importanza eliminare totalmente l’aria dalla camera di sterilizzazione per ottenere vapor d’acqua saturo per il quale è applicabile la suddetta corrispondenza biunivoca temperatura-pressione.

Questa condizione non è “scontata” in quanto l’aria ha densità circa 1.7 volte maggiore del vapore a parità di condizioni temperatura / pressione e per questo tende a stratificarsi nelle parti inferiori della camera e dei recipienti vuoti ed aperti con bocca verso l’alto ed a rimanere intrappolata all’interno dei carichi porosi. Ciò impedisce il raggiungimento delle adeguate condizioni di sterilizzazione.

La variabile tempo.

Quando si sterilizza un oggetto contaminato in superficie, la sua temperatura di sterilizzazione si raggiunge praticamente quando la camera dell’autoclave ha raggiunto quella temperatura.

Quando invece si sterilizza un oggetto contaminato nella sua massa (ad esempio un pacco di tessili, una bottiglia contenente una soluzione farmaceutica, un barattolo contenente una preparazione alimentare, un diluente per batteriologia) la temperatura di sterilizzazione nel punto interno “più freddo” si raggiunge con ritardo rispetto alla camera. Tale ritardo può essere assai elevato se l’oggetto od il suo contenuto sono di notevole massa e calore specifico, densi, viscosi. Tale ritardo deve quindi essere valutato attentamente quando si imposta il tempo di

sterilizzazione, semprechè non sia possibile prelevare la temperatura che fa partire il tempo di sterilizzazione.

Per esempio un litro di liquido dovrebbe essere autoclavato per 25 minuti dopo che la camera ha raggiunto la temperatura di 121°C, mentre per un contenitore di 4 litri possono essere necessari sino a 60 minuti.

La variabile contaminazione iniziale o “bioburden”.

Conseguenza dell’andamento progressivo di sterilizzazione è che la citata probabilità di prodotto definibile “sterile” si raggiunge (a parità di temperatura) con tempi di processo più brevi, se il prodotto è inizialmente poco contaminato e se i microorganismi sono poco resistenti al calore umido.

Ogni procedura atta a ridurre la contaminazione microbiologica iniziale (purezza dei componenti, pulizia delle attrezzature, igiene del personale, pulizia dei contenitori) deve pertanto essere attuata per rendere la sterilizzazione più efficace.

La carica microbica iniziale ha un’importanza fondamentale per il buon esito di un processo di sterilizzazione. Infatti, come presentato in precedenza, la sterilizzazione non è un processo tutto/niente, ovvero a barriera di potenziale (come si riteneva una volta), ma si sviluppa progressivamente nel tempo. Quindi più bassa è la carica microbica iniziale, più il processo di sterilizzazione risulta efficace.

Tutte le procedure atte a ridurre la carica microbica iniziale sono da mettere in pratica.

La variabile tecnologica per la sterilizzazione.

La corrispondenza biunivoca temperatura – pressione valida per il vapor d’acqua saturo ha una importante conseguenza sulle possibilità di regolazione di una sterilizzatrice a vapore; essa può essere effettuata sia in base alla pressione che alla temperatura.

Il controllo (verifica delle condizioni) del processo di sterilizzazione sarà certamente effettuato in base alla temperatura (più la pressione, qualora richiesto) mentre la regolazione (le regole per realizzare cicli di sterilizzazione efficaci) è auspicabile sia effettuata in base alla pressione.

La pressione ha la caratteristica di essere in ogni istante univoca nella camera di sterilizzazione e di

omogeneizzarsi con velocità paragonabile a quella del suono; queste prerogative danno il vantaggio di usufruire di un affidabile parametro fisico rappresentativo del processo.

Non altrettanto offre il parametro temperatura che varia (anche se di poco) da punto a punto della camera perché si omogeneizza con una certa lentezza.



Autoclave Beta 35 InternationalPBI con regolazione di processo mediante temperatura rilevata da sonda liberamente posizionata nel carico.

Un vantaggio operativo tipico delle sterilizzatrici con regolazione di processo in base alla pressione sono la possibilità di prevedere fasi di vuoto pulsato o vuoto dinamico per eliminare l’aria inizialmente presente nella camera e dal carico. Come è stato detto in precedenza, la presenza residua di aria impedisce il raggiungimento delle adeguate condizioni di sterilizzazione.

Più difficile da realizzarsi con autoclavi tradizionali nelle quali l’aria inizialmente presente si elimina dalla camera per “dislocazione”; in questo caso è il vapore progressivamente prodotto che spinge in modo naturale l’aria fuori dalla camera di sterilizzazione.

Un altro vantaggio tipico delle sterilizzatrici più evolute con regolazione di processo in base alla pressione si ottiene quando si sterilizzano recipienti indeformabili, chiusi, contenenti soluzioni acquose; in questi casi la pressione totale che si sviluppa nel recipiente è notevolmente superiore a quella che si sviluppa nella camera in conseguenza del fatto che dalla camera è stata eliminata tutta l’aria, mentre quella presente nel volume di testa del recipiente rimane e si dilata notevolmente con l’aumentare della temperatura. Poiché la pressione differenziale è notevole, gli effetti possono essere drammatici, ad esempio scoppio dei recipienti oppure salto o perdita di tenuta di tappi di gomma non ben ghierati. In

questi casi si possono implementare cicli di sterilizzazione con fasi “in contropressione”, in grado di risolvere tutti questi problemi.

E' noto che se si sterilizzano soluzioni in recipienti di plastica chiusi si può riscontrare la deformazione di questi contenitori dovuta all'innalzamento della temperatura ed alla pressione differenziale che fa “spanciare” verso l'esterno il recipiente in fase di riscaldamento mentre, se non rotto e/o non ha avuto perdite, collassa verso l'interno in fase di raffreddamento. Per queste applicazioni sono disponibili sterilizzatori che presentano cicli con immissione di aria e vapore in contropressione in grado di completare efficacemente la sterilizzazione evitando deformazioni o peggio il collassamento dei contenitori sensibili alla temperatura e pressione di sterilizzazione.



Sterilizzatrice Serie VEGA PBI-Fedegari con ciclo con immissione di aria e vapore in contropressione.

Speciali applicazioni che comportano cicli di sterilizzazione sino a 141°C sono possibile grazie a sterilizzatrici più evolute in grado di raggiungere pressioni max sino a 4bar.

Tecnologia per la sicurezza.

Oltre alle prerogative per sterilizzare in modo efficace i carichi più disparati, numerose sono le soluzioni tecnologiche per la sicurezza proposte dalle sterilizzatrici di ultima generazione.

E' noto il rischio di scoppio posto dai recipienti di vetro chiuso contenente soluzione acquosa che vengono estratti troppo caldi dall'autoclave. Queste situazioni sono evitabili con l'impiego di sterilizzatrici che prevedono fasi di raffreddamento finale forzato e sistemi di apertura che consentono l'accesso al carico solo a seguito di verifica della temperatura di sicurezza e della pressione atmosferica.



Sterilizzatrice Serie Virgin PBI-Fedegari con apertura vincolata a temperatura e pressione di sicurezza .

Le fasi di chiusura ed apertura delle autoclavi in particolare da laboratorio sono due momenti che si affrontano oggi in completa sicurezza e facilmente grazie a sistemi automatici che garantiscono la perfetta tenuta della chiusura senza sforzi, con semplici interventi ergonomicamente corretti.

Rilevante è la possibilità offerta da alcuni tipi di sterilizzatrici a vapore di trattare **materiale ad alto rischio biologico** prevedendo appositi cicli di sterilizzazione assolutamente privi di fuoriuscite di aria o reflui di condensa contaminati.

I sistemi di controllo computerizzato che sovrintendono i cicli di sterilizzazione delle autoclavi più moderne garantiscono accuratezza e riproducibilità dei processi potendo gestire segnali provenienti da più sensori di pressione e sonde di temperatura; presentano sistemi di accesso protetti a dati e programmi per evitare manomissioni e uso improprio dell'apparecchiatura. In caso di controllo computerizzato i cicli di sterilizzazione possono beneficiare della cosiddetta funzione F_0 , che è un tempo di sterilizzazione equivalente alla temperatura di riferimento di 121°C che tiene conto anche degli effetti letali del calore delle fasi di riscaldamento e raffreddamento. Molto comoda ed abituale nelle attività farmaceutiche ed alimentari la funzione F_0 offre il vantaggio di ottimizzare l'energia necessaria prevista per un carico specifico da sterilizzare evitando la sovraesposizione alla massima temperatura dello stesso carico.

Buone Pratiche di Laboratorio e qualità dei risultati.

Tutti i documenti di riferimento internazionali definiscono la sterilizzazione come “PROCESSO SPECIALE”, cioè un processo i cui risultati non sono verificabili con prove sul prodotto ottenuto. Questa

situazione determina una serie di impegni che per alcune applicazioni costituiscono veri e propri obblighi normativi. In particolare:

1. le sterilizzatrici vanno qualificate ed i processi convalidati prima di utilizzo routinario;
2. il personale va qualificato, responsabilizzato, e aggiornato;
3. i processi routinari vanno monitorati;
4. le sterilizzatrici vanno mantenute efficienti.

Indipendentemente dal livello tecnologico delle sterilizzatrici, quindi dalla disponibilità di strumenti per il controllo fisico e la registrazione dei processi di sterilizzazione, è indispensabile accertare l'effettivo raggiungimento della sterilizzazione in accordo alla Buona Prassi di Laboratorio.

Per ottenere questo scopo si deve adottare un sistematico monitoraggio impiegando sistemi di controllo fisici, chimici, biologici con indicatori specifici. I risultati che si ottengono dai tre diversi procedimenti non sono sovrapponibili, ma complementari e pertanto tutti necessari.

Monitoraggio fisico: Include il classico test di Bowie-Dick per valutare la capacità di penetrazione del vapore e la rimozione dall'aria nei corpi porosi, in particolare nei pacchi tessili. Per questo test si utilizza un "pacco prova" conforme alla Normativa BS7720. Al termine del ciclo di sterilizzazione, si estrae il pacco dalla camera di sterilizzazione e si verifica se il colore del foglio centrale dotato di indicatore chimico sia virato in modo omogeneo. Questo test deve essere eseguito ad intervalli regolari ed i risultati registrati su apposite schede da conservare.

Monitoraggio chimico: sfrutta le proprietà di sostanze coloranti capaci di virare di colore se sono esposte al calore ed alla pressione di riferimento; danno informazioni sull'avvenuta effettuazione del ciclo ma non sull'efficacia.

In pratica serve per evidenziare e separare i prodotti già autoclavati, da quelli non ancora introdotti in autoclave o per evidenziare trattamenti di sterilizzazione abortiti. L'indicatore chimico dovrebbe essere applicato a tutto il materiale che si intende sottoporre a trattamento di sterilizzazione.

Monitoraggio biologico: si esegue mediante indicatori biologici (spore di microrganismi particolarmente resistenti al processo di sterilizzazione). Questo monitoraggio ha lo scopo di

verificare l'effettiva adeguatezza del processo di sterilizzazione nella disattivazione microbica. Il test si presenta sottoforma di fiale che devono essere inserite nella camera di sterilizzazione e nel "carico" da sterilizzare. Al termine del ciclo la fiala viene trasferita in incubatore per facilitare la moltiplicazione dei microrganismi eventualmente sopravvissuti. La presenza di sopravvivenza è visualizzata dal viraggio di colore della fiala a seguito del metabolismo dei microrganismi. Il viraggio di colore è pertanto indicazione di incorretto trattamento di sterilizzazione. Se il trattamento in autoclave è affidato in laboratorio alla sola impostazione dei parametri fisici (temperatura-tempo) senza curarsi del corretto funzionamento e caricamento dell'autoclave stessa, ci sono buone probabilità che la sterilizzazione risultante sia un insuccesso.



Indicatore biologico "Prospore 2"

costituito da doppia fiala:

- Fiala interna in vetro con terreno nutritivo ed indicatore di pH
 - Fiala esterna in materiale plastico con tappo.
- Tra fiala interna ed esterna è inserita carta bibula con spore.

Conclusioni

Con le conoscenze acquisite e consolidate con la pubblicazione di numerosi documenti normativi ufficiali, con la disponibilità di sterilizzatrici moderne ed evolute e di adeguati sistemi fisici, chimici, biologici di controllo, la sterilizzazione a vapore si conferma oggi quale metodo di elezione per l'eliminazione o l'inattivazione di agenti biologici in modo sicuro ed efficace in ambito farmaceutico, in ambito sanitario, nelle produzioni alimentari e di dispositivi medici così come per le molteplici applicazioni di laboratorio, sia di analisi che di ricerca.