

Considerazione sulla sterilizzazione a vapore del circuito idraulico nelle apparecchiature emodialitiche

P. Partemi (Baxter S.p.A.)

In questi ultimi 15 anni si è assistito ad un notevole progresso in campo dialitico. La tecnologia applicata alle apparecchiature, ai biomateriali, nonché la migliore conoscenza delle problematiche inerenti alla depurazione, hanno permesso di ridurre la mortalità nei pazienti in ESRD. Sicuramente un aspetto importante, che ha permesso di migliorare il trattamento dialitico, è il controllo delle infezioni, il miglioramento della sterilità dell'intero sistema e l'asetticità delle procedure. In emodialisi, un notevole interesse è stato posto sul controllo dell'acqua della soluzione dializzante; infatti un paziente, durante le 4 ore di terapia, viene posto ad un contatto indiretto con circa 120 litri di acqua (8). La qualità di quest'ultima deve sempre essere tenuta sotto controllo, soprattutto durante i trattamenti con dializzatori ad alta permeabilità e in nuove tecniche di preparazione di liquidi di reinfusione on-line. Un controllo efficace deve essere garantito all'intera catena che porta alla produzione del dialisato:

- l'acqua di rete
- i sistemi di trattamento e di distribuzione (inclusi gli scarichi)
- i concentrati
- la geometria idraulica e funzionale della macchina

Se uno qualsiasi di questi anelli è debole, l'intero sistema presenta un elevato rischio di contaminazione (8). La qualità microbica del fluido di dialisi non è soggetta a nessun standard. La farmacopea europea ha fissato le caratteristiche microbiche per l'acqua trattata (100 CFU/ml e contenuto endotossinico non superiore a 0.25 EU/ml) e per le soluzioni concentrate (sterili con contenuto inferiore di 0.5 EU/ml di endotossine). Di conseguenza, il bagno di dialisi prodotto dalla diluizione di soluzioni concentrate con acqua trattata, dovrebbe presentare le stesse esigenze microbiologiche. E' soprattutto all'interno dell'apparecchiatura che le contaminazioni sono particolarmente evidenti; in corso di dialisi infatti, la crescita batterica è particolarmente favorita da fattori quali la temperatura, il pH, il glucosio, la presenza di sostanze organiche (8). Le membrane per dialisi, se non sono danneggiate, non permettono il passaggio dei batteri, ma la crescita batterica è però sempre associata ad un aumento dei prodotti della degradazione delle membrane batteriche i quali possono passare attraverso i pori delle membrane (7). In genere questi derivati batterici sono polimeri di alto peso molecolare, maggiore di 200,000 dalton, ma alcuni sono sottoframmenti o forme elementari di basso peso molecolare da 500 a 1500 dalton, che pertanto possono passare attraverso la membrana nel sangue, per retrofiltrazione e retrodiffusione, causando una stimolazione cronica del sistema immunitario, attraverso l'attivazione del complemento e/o diretta stimolazione dei monociti (6). Lo stato infiammatorio indotto nell'organismo dal rilascio di citochine è stato ipotizzato contribuire a varie complicazioni a breve e lungo periodo, come i depositi di amiloide nelle articolazioni ossee e nei tessuti connettivi, che sono una causa di significative affezioni morbose in pazienti di emodialisi. Di conseguenza, la contaminazione batterica del dialisato è un fattore determinante di bioincompatibilità.

Il controllo delle contaminazioni interne delle apparecchiature dialitiche

I termini disinfezione e sterilizzazione sono spesso utilizzati indifferentemente per indicare le procedure di controllo delle contaminazioni da microrganismi. In realtà per sterilizzazione si intende la completa distruzione o rimozione di tutti i microrganismi viventi (protozoi, funghi, virus, batteri e spore). Il termine disinfezione è stato definito come la rimozione o distruzione dei microrganismi escluse le spore batteriche (Maurer, 1984) (9). Pertanto in dialisi è più corretto parlare di disinfezione, quale procedura di eliminazione di un significativo numero di microrganismi senza però arrivare alla loro completa distruzione.

Miroclav C: sterilizzazione del circuito idraulico con vapore sotto pressione

In generale le tecniche di disinfezione e sterilizzazione necessitano di sistema che sia capace di generare un'energia tale da provocare dei danni irreversibili ai microrganismi. Il calore viene utilizzato quale agente sterilizzante sotto due differenti forme: umido e secco. I microrganismi che sono sottoposti all'azione del calore umido (ad esempio vapore saturo), sono distrutti dalla denaturazione irreversibile delle proteine strutturali e degli enzimi. La temperatura a cui sopraggiunge tale denaturazione dipende strettamente dalla quantità di acqua presente: ad esempio, l'albumina dell'uovo messa in un ambiente contenente il 50 % di acqua coagula a 56 °C, mentre in ambiente secco coagula a 160 - 170 °C. Nella sterilizzazione a calore secco, il principale processo letale è considerato essere quello ossidativo ed, in generale, tale sterilizzazione richiede alte temperature e lunghi tempi di esposizione. Il tempo necessario per abbattere la carica dei microrganismi dipende dalla resistenza innata al calore dei ceppi, dalla temperatura del trattamento sterilizzante, dalle condizioni di crescita, dal particolare mezzo di cultura e dalla temperatura di incubazione. In generale i batteri vegetativi, i protozoi e i funghi non sopravvivono al calore umido ad una temperatura di 80 °C per 10 min. o 73 °C per 15 min (9). La ragione per cui le spore batteriche resistono a più alte temperature, sembra risiedere nella presenza di un involucro esterno i cui componenti peculiari sono l'acido dipicolinico (ADP) chelato con ioni calcio. A parità di temperatura, l'efficienza sterilizzante del vapore saturo è maggiore del calore secco (tab.1.0)

| PROCESSO | TEMPERATURA (°C) | TEMPO DI STERILIZZAZIONE(min) |
|------------------------------|------------------|-------------------------------|
| Calore secco(*) | 160 | 120 |
| | 170 | 60 |
| | 180 | 30 |
| (*) Farmacopea europea 1990 | | |
| Calore umido (+) | 121 | 15 |
| | 126 | 10 |
| | 134 | 3 |
| (+) Medical research council | | |

Tab 1.0 Tempo di sterilizzazione minimo per date temperature

Gli standards riportati in tabella 1.0, relativi al calore umido fanno riferimento alle condizioni di sterilizzazione con vapore saturo. Con il termine isaturato si intende una condizione particolare di temperatura e pressione in cui è massima la presenza di vapore in equilibrio con il suo liquido. In genere tanto più alta è la temperatura, tanto più alta è la pressione di vapore in saturazione. La presenza di aria nel sistema cambia questa relazione: in una camera chiusa in cui non c'è aria la temperatura di 121 °C dell'acqua viene raggiunta ad una pressione di 1,5 atm; se dalla camera viene rimossa il 50 % dell'aria, a parità di pressione, la temperatura raggiunta è di solo 112 °C (9), dunque è fondamentale la procedura di degasazione dell'acqua, che nel caso del Miroclav viene effettuata portando rapidamente la temperatura a 85 °C. Il circuito idraulico dell'apparecchiatura Baxter, Miroclav C, è stato progettato per poter eseguire una procedura di sterilizzazione a calore umido delle sue componenti interne. In pratica, finita la dialisi e dopo aver effettuato un descaling di 10 minuti con acido citrico ad elevata concentrazione 3%, la macchina fa funzionare il circuito idraulico come un autoclave, capace di sterilizzare ad una temperatura di 121 °C e a 1,5 atm di pressione tutte le pareti e i componenti interni in contatto con il bagno di dialisi. Le parti strutturali e funzionali di tale circuito sono state pensate per poter lavorare a temperature e pressioni elevate: acciaio, polisulfone, polietere sulfone, polietere chetone, ceramica garantiscono una notevole tenuta e affidabilità, così come i vari sensori e attuatori sono stati testati per operare in queste condizioni. L'efficacia di un tale sistema di sterilizzazione è garanzia di sicurezza per il paziente, il quale non viene in contatto con un dialisato potenzialmente contaminato da agenti biologici o chimici, derivanti dai prodotti di disinfezione. Tale efficacia è stata testata verificando la permanenza delle condizioni di non contaminazione del circuito, per più di 72 ore dalla procedura di sterilizzazione. Un'ulteriore conferma della superiorità della sterilizzazione a vapore, viene dall'efficacia che questa ha sulla rimozione del biofilm (10).

La rimozione del biofilm dal circuito idraulico

Il biofilm è un deposito di microorganismi che si trovano in una matrice di materia organica e minerale. Questa matrice, chiamata glicocalice, forma una membrana che gradatamente ricopre cellule circospecie, da qui il termine biofilm (1,2,3,5). Il glicocalice cattura elementi nutritivi e fornisce una barriera contro la penetrazione degli agenti disinfettanti. Il biofilm si sviluppa potenzialmente su tutte le superfici immerse in ambienti acquatici naturali, siano esse superfici biologiche (piante acquatiche e animali) o inorganiche (pietre, solidi, metallo, vetro, plastica etc.). La sua formazione è particolarmente rapida in sistemi contenente fluidi in movimento, dove è possibile fornire una regolare riserva di elementi nutritivi ai batteri. La formazione di questa membrana biologica segue una precisa successione di differenti fasi (Fig. 1)(1,2,3). Le cellule microbiche si attaccano decisamente a qualunque superficie immersa in un ambiente acquatico (nel caso delle del circuito idraulico, questo risulta particolarmente facilitato all'interno delle tubature corrose dall'usura e dagli agenti chimici usati per la disinfezione). Le cellule immobilizzate crescono, si moltiplicano e producono polimeri extracellulari che si estendono alle cellule vicine, che formano una avviluppata matrice di fibre (glicocalice) che porta alla formazione del biofilm (5). Quando il biofilm è in equilibrio, hanno luogo numerosi scambi tra le fasi solide e liquide. Un biofilm maturo è caratterizzato da uno scambio di germi vivi e morti, di prodotti originatisi dal metabolismo di microorganismi vivi e di composti derivati dalla parete cellulare di microorganismi morti e vivi. Il biofilm si trova normalmente nelle macchine per dialisi, ed è talvolta anche visibile come deposito cremoso giallognolo ricoprente la superficie interna delle tubature semitrasparenti (5). Vale la pena notare che la crescita del biofilm può anche essere più importante sulla superficie di componenti idraulici la cui struttura facilita l'aderenza batterica come recipienti, vasi di espansione, valvole, connettori, etc. La sua presenza nel circuito idraulico delle apparecchiature emodialitiche può anche pregiudicare la dinamica del fluido, aumentando la resistenza di trasferimento del calore nello scambiatore termico o causando un parziale blocco dei flussimetri. Il biofilm può anche inficiare la funzione specifica delle valvole o l'accuratezza di misurazione dei sensori ottici e conseguentemente, pregiudicare la normale operatività della macchina di dialisi. Gli studi sul biofilm attaccato alla superficie interna dei tubatismi, hanno mostrato che esso contiene batteri e endotossine in concentrazioni che vanno rispettivamente

da 1.103 a 1.106 CFU/cm² e da 1 a 10 EU/cm². E' importante comprendere che l'uso di un fluido di dialisi libero da germi e endotossine non esclude i rischi e pericoli di rilascio di batteri e endotossine dal biofilm, il quale agisce da pericolosa riserva di contaminazione. Uno studio recente (10) dimostra che la procedura di sterilizzazione Miro-Clav è in grado di eliminare i batteri e le endotossine generati dal biofilm, creato in-vitro, sulla superficie di un gruppo rappresentativo di componenti dal circuito idraulico del Miro-Clav. Un tale sistema garantisce una sicurezza superiore, grazie all'azione che il vapor saturo è capace di attuare nelle parti dell'idraulica più difficili da raggiungere; ciò che emerge evidente dallo studio citato, è la maggior efficacia della sterilizzazione se effettuata dopo un descaling con citrico al 3%, questo perchè la deterzione-disincrostazione, la rimozione di residui organici e glucosio, permette un'azione più diretta sui contaminanti biologici. La possibilità di non utilizzare i comuni disinfettanti porta notevoli vantaggi non solo al paziente ma anche al personale che deve maneggiare quotidianamente questi prodotti, i quali generano reazioni allergiche da contatto o inalazione. Rispetto per il paziente e dell'ambiente di lavoro, nonché drastica riduzione di immissione di potenziali inquinanti, che sono immessi negli scarichi ospedalieri con i relativi problemi di smaltimento. Inoltre, non dovendo disinfettare la macchina con agenti chimici, si ha una sostanziale riduzione dei consumi di acqua trattata. Gli anni futuri vedranno impegnate le maggiori aziende nel progettare i sistemi biomedicali più rispettosi dell'ambiente naturale, questo perchè operare per la salute è innanzitutto prevenire la malattia, e volendo utilizzare un paradosso: è da evitare che la cura dei pochi pregiudichi la salute di molti.

Bibliografia essenziale:

1. Characklis WG, Marshall KC. Biofilms: basis for an interdisciplinary approach. In *biofilms*, ed by Wiley J & sons, Inc, New York, Chicester, Toronto and Singapore, 1990, 1, 3-15
2. Nichols WW. Susceptibility of biofilm to toxic compounds. In: Characklis WG, Wilderer PA. *Structure and Function of biofilm*. ed. by Wiley J, Chicester 1989, 321-331
3. Marshall KC. Biofilm: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surface. *ASM news*, 1992, 58 (4), 202-207
4. Degremont A. et al. Evidence of bacterial biofilm in tubing from fluid pathway of hemodialysis system. *EDTA, XXX congress*, 1993, abstract, 130.
5. Phillips G. et al. Persistence of microflora biofilm within fluid pathways of contemporary haemodialysis monitors (Gambro AK 10). *Journal of hospital infection*, 1994, 27, 117-125
6. Takahashi I, et al. structural requirements of endotoxic lipopolysaccharides and bacterial cell walls in induction of interleukin-1. *Blood Purification*, 1989, 6, 188-206
7. Vanholder R. et al Endotoxins transfer through dialysis membranes: small versus large pore membrane. *ND&T* 1992, 7, 333-339
8. Ghezzi P. et al. La disinfezione delle macchine per dialisi. *Tecniche nefrologiche e dial. è95*, wichtig ed. 189-209
9. Russel AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ. *Principles & practice of disinfection, preservation & sterilization II* ed. Blackwell science, 18, 483-517
10. Baxter laboratories. To be published