

# **Efficacia della sterilizzazione a vapore per il controllo delle infezioni nelle apparecchiature**

Dr. Paolo Partemi

I concetti di sterilizzazione e disinfezione sono spesso presentati con due definizioni assolute: "la sterilizzazione è un processo capace di distruggere o rimuovere ogni microrganismo vivente", mentre "per disinfezione è da considerarsi la procedura che elimina i microrganismi pericolosi escluse le spore batteriche". Queste asserzioni sono in realtà una dichiarazione d'intenti, espressioni filosofiche che hanno prodotto un'aura di mistero e confusione (1); in realtà il controllo della sterilizzazione e disinfezione è basato su una metodologia scientifica che ha come base la determinazione empirica di una possibile contaminazione. Quindi, dal punto di vista pratico, "per sterilizzazione s'intende quella procedura capace di ridurre la contaminazione batterica ad un livello tale da non essere rilevato dai test batteriologici". La parola chiave di tutta la definizione è "Procedura di Sterilizzazione o Disinfezione", dove per procedura non s'intende solo il sistema che realizza la disinfezione o sterilizzazione, ma anche la modalità con cui si controlla il processo. In generale, nelle pratiche di controllo qualità dei processi di sterilizzazione/disinfezione esistono due approcci metodologici (2):

- quello che determina "in modo diretto" lo stato di contaminazione del "prodotto" attraverso un test batteriologico, per esempio attraverso l'inoculazione di un campione in un mezzo di coltura.
- quello che monitorizza il processo di sterilizzazione/disinfezione e che stabilisce "in modo indiretto" lo stato del "prodotto" sottoposto al procedimento stesso.

Dunque l'efficacia del processo di sterilizzazione/disinfezione passa attraverso la corretta procedura di Eliminazione e Rilevazione delle contaminazioni microbiologiche. Il problema della sterilità in emodialisi (3) è di natura polifattoriale e può essere immaginato come una catena i cui anelli sono rappresentati da:

- Qualità dell'acqua di rete
- Sistemi di trattamento e distribuzione
- I concentrati e liquidi di reinfusione e priming
- La geometria idraulica
- Efficacia della procedura di controllo delle contaminazioni interne ed esterne all'apparecchiatura
- La sterilità del materiale "monouso" (linee, filtri,...)
- L'asetticità di tutte le manovre (connessione, deconnessione, incidenti.....)

Appare chiaro come l'apparecchiatura riveste un ruolo centrale nella catena della sterilità, perchè prepara, controlla e somministra il dialisato, la cui qualità finale è influenzata dalla qualità dell'acqua di rete, dai concentrati e liquidi di reinfusione e priming, dal design del circuito e dalle procedure di sterilizzazione/disinfezione. Il controllo di qualità di ciascun elemento coinvolto è differente. Per i concentrati e le soluzioni di reinfusione la procedura di controllo qualità è diretta: ogni lotto prodotto viene campionato e, prima di essere immesso in commercio, si deve certificare che la campionatura sia sterile o batteriostatica e rispondente alle caratteristiche richieste dalle normative vigenti (composizione dichiarata, presenza di metalli, qualità microbiologica). La procedura che dovrebbe garantire la corretta produzione del dialisato è impostata secondo un controllo indiretto della qualità del prodotto. Tale controllo qualitativo Indiretto richiede sia l'impostazione di una corretta procedura di miscelazione e sterilizzazione/disinfezione, e questo attraverso i controlli del:

- corretto rapporto di diluizione del concentrato
- corretto rapporto di diluizione del disinfettante o temperatura raggiunta (nel caso di sterilizzazione/disinfezione termica)
- tempo di contatto del disinfettante o mantenimento della temperatura impostata
- tempo di risciacquo o raffreddamento

sia nella redazione della corretta modalità di controllo del dialisato prodotto, ovvero:

- modalità di prelievo
- periodicità di campionatura
- tipologia di esami (batteriologicalo, endotossinico, ionico .....)
- accuratezza dell'esame svolto

In questo ambito la figura del tecnico riveste un'importanza cruciale, quale responsabile della procedura suddetta deve fare in modo che la sua attuazione sia la migliore possibile, ma anche apportare eventuale modifiche. Un esempio può essere rappresentato dalla durata dei cicli di disinfezione/ disincrostazione. Se per un'apparecchiatura nuova è sufficiente un tempo di contatto di 30' per un dato disinfettante e/o disincrostante, la stessa apparecchiatura con alle spalle più di 10.000 ore di lavoro, può richiedere dei tempi maggiori a causa dell'usura dei componenti del circuito idraulico che favoriscono il deposito e la crescita batterica intra ed extra-dialisi. Un'altro aspetto importante che permette la redazione di una perfetta procedura di controllo delle contaminazioni del dialisato è la presenza di linee guida che indichino chiaramente quali siano gli standard a cui occorre fare riferimento nel controllo qualità del dialisato (Tabella 1).

Gli standard di Qualità (tab.1)			
Standard	500	Dialisato	Pirogenità dell'acqua
AAMI RD5R-1992	<200 CFU/ml	<2000 CFU/ml	LAL test limit <5EU/ml* (1 ng/ml)
ISO TC150/SC2 WG5 - 3rd draft	<200 CFU/ml	<2000 CFU/ml	Non pyrogenic
Eur. Pharmacopeia 01/93	<100 CFU/ml		<0,25 EU/ml
CAN 3-Z364.2.2-M86	<200 CFU/ml		Nin pyrogenic 1ng/ml: LAL test limit (10 EU/ml)
SWEDISH	100-200 CFU/ml	100-2000 CFU/ml	Non pyrogenic <0,25 EU/ml
UK	<200 CFU/ml	<2000 CFU/ml	

Purtroppo non esistono delle linee guida europee o nazionali e quindi occorre far riferimento a standard di altri paesi. Anche il ruolo delle Aziende è fondamentale perchè devono indicare chiaramente la procedura di disinfezione/sterilizzazione migliore per la propria apparecchiatura.

### **Efficacia della procedura di sterilizzazione a vapore del circuito idraulico**

Il calore è stato uno dei primi sistemi utilizzati dall'uomo per ridurre le infezioni batteriche. L'autoclave è tipicamente una macchina termica capace di raggiungere temperature uniformi superiori ai 120 °C. Per garantire la sterilizzazione occorre che siano ben definite 2 grandezze: la temperatura e il tempo minimo di stazionamento per la sterilizzazione termica, le raccomandazioni a livello internazionale sono 15' ad una temperatura di 121 °C oppure 10' a 126 °C o 3' a 134 °C. Per arrivare a tali temperature, senza che la pressione salga eccessivamente, occorre utilizzare un vapor d'acqua saturo privo di aria, in quanto la capacità termica dell'acqua è di gran lunga superiore a quella dell'aria. In altri termini la relazione:

$$DU=nC(T_2-T_1)$$

afferma che l'energia termica DU di cui ho bisogno per innalzare la temperatura da T1 a T2, dipende dal numero di moli n dell'acqua (e quindi dal volume del circuito idraulico) e dalla

capacità termica C dell'acqua, ma affinché un circuito idraulico di un'apparecchiatura possa funzionare come un'autoclave occorre che:

- I materiali che lo compongono (sensori, pompe, etc..) resistano alle alte temperature (>250 °C)
- Tutto il circuito sia in tenuta di pressione (>2,5Atm)
- Il vapor saturo deve raggiungere tutte le parti del circuito
- Un sistema di degasazione estremamente efficiente
- Gli scambiatori di calore efficienti e funzionali
- Un sistema di sicurezze per gli operatori e per il paziente

L'apparecchiatura Miroclav C, prodotta dalla Baxter, è per l'appunto un'apparecchiatura che può essere immaginata con un circuito idraulico "double face": durante la dialisi esso esegue la gestione completa della preparazione del dialisato nonché dell'ultrafiltrazione necessaria secondo quanto prescritto dalla terapia; al termine della dialisi le stesse componenti sono capaci di effettuare una sterilizzazione sul falsariga di una vera e propria autoclave. La procedura di sterilizzazione del Miroclav C prevede:

- Descaling di 2 minuti con citrico al 3 - 5%
- lavaggio di 3 minuti
- Riempie il circuito e porta la temperatura a 125 °C in circa 5 minuti
- L'intero circuito rimane chiuso alla pressione di 1,5 Atm
- Il vapor saturo viene fatto circolare (700 ml/min) per 20 minuti in tutte le parti del circuito compresi i connettori per l'emodializzatore e i concentrati.
- Al termine della sterilizzazione il circuito viene raffreddato e rimane chiuso fino al riavvio di una nuova procedura dialitica (mantenimento della sterilità)
- Durante la fase di autoclave tutte le tuberie esterne e i relativi connettori sono chiusi all'interno della macchina
- La macchina da' l'accesso ai connettori solo se la temperatura interna è < di 40 °C
- L'acqua (sterilizzata) all'interno del circuito viene immessa nello scarico solo se la temperatura < di 40 °C

Tale procedura è stata oggetto di validazione. Innanzitutto la temperatura di 125 °C all'altezza del termistore nel blocco di preparazione, unitamente al regime di flusso di 700 ml/min garantisce un temperatura non inferiore ai 121 °C all'interno di tutte le componenti idrauliche; inoltre il tempo di stazionamento ai suddetti flussi per 20' garantisce la totale distruzione di ogni microbatterio. Studi specifici ne hanno dimostrato l'efficacia dal punto di vista batterico e virale nonché nella rimozione del biofilm, che rappresenta uno degli aspetti meno indagati ma non per questo meno importante.

### Test Battericida

Per verificare l'efficacia della procedura in termini di killing rate delle specie batteriche più patogene e solitamente riscontrate nei liquidi di dialisi, è stato introdotto all'interno del circuito idraulico dell'apparecchiatura una miscela di cinque differenti batteri: K. Pneumoniae, E. Coli, S. Aureus, P. Aeruginosa, C. Albicans a concentrazioni variabili da 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup>. Quindi è stata portata la temperatura a 125 °C per 20' senza lavare la mistura. Terminata la sterilizzazione sono stati effettuati 5 prelievi in altrettanti punti del circuito idraulico e inoculati in un mezzo di coltura e verificata la crescita batterica dopo 48 ore.

Efficacia della sterilizzazione a vapore. Capacità battericida (tab.2)					
Prima e dopo la procedura di autoclave (20 min. ad una temperatura di 125 C° e 1,5 Atm)					
Prima	E.Coli cfu/ml	S.Aureus cfu/ml	P.Aeruginos cfu/ml	C.Albicans cfu/ml	K.Pneumoniac cfu/ml
Tab 1	1,0x10 <sup>7</sup>	1,0x10 <sup>6</sup>	8,8x10 <sup>6</sup>	2,1x10 <sup>6</sup>	3,0x10 <sup>6</sup>
Tab 2	1,2x10 <sup>7</sup>	1,4x10 <sup>6</sup>	6,6x10 <sup>6</sup>	5,5x10 <sup>6</sup>	2,5x10 <sup>6</sup>

Tab 3	$1,4 \times 10^7$	$1,9 \times 10^6$	$6,7 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$
Tab 4	$1,6 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$
Tab 5	$1,3 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$	$9,1 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$
<b>Dopo</b>					
Tab 1	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Tab 2	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Tab 3	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Tab 4	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Tab 5	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.

Efficacia della sterilizzazione a vapore: Capacità Sporicida (tab.3)	
Risultato ottenuto con Bacillus Subtilis	
Concentrazione iniziale <sup>80</sup>	$1,9 \times 10^7$ cfu/ml
Dopo 5 min. dalla decalcificazione	$6,8 \times 10^4$ cfu/ml
Prima della sterilizzazione	$1,7 \times 10^5$ cfu/ml
Dopo la sterilizzazione in tutti i punti prelievo	< 10 cfu/ml
Dopo incubazione per 7 giorni a 37°C	Nessuna crescita

Come risulta evidente nella tabella di tabella 2, dopo la procedura di sterilizzazione non si evidenziano crescite batteriche da nessun terreno inoculato con i 5 differenti campioni, il killing rate della procedura di sterilizzazione del miroclav può essere quantificato in 6 logaritmi di Unità Formanti Colonie di 5 differenti agenti inquinanti. L'efficacia della sterilizzazione può essere determinata solo con una verifica dell'azione della procedura di autoclave sulle spore batteriche. Per questo motivo, è stato effettuato uno studio inoculando all'interno dell'apparecchiatura una concentrazione di  $10^7$  UFC di Bacillus Subtilis, a seguito del quale è stata avviata la completa procedura di disinfezione e autoclave, i prelievi di liquido sono stati effettuati in 5 differenti punti del circuito idraulico in differenti momenti della procedura di sterilizzazione. Al termine della procedura è stato effettuato anche un test di sterilità inoculando il liquido in un mezzo di coltura per 7 giorni a 37 °C. La tabella 3 mostra come solo dopo l'autoclave si aveva un reale abbattimento della carica di spore al di sotto del minimo rilevabile (< 10UFC).

### Capacità virucida della procedura di autoclave.

Con una survey condotta presso l'Istituto di Virologia, Infettologia ed Epidemiologia di Stoccarda (Germania), si è voluto verificare la sicurezza della procedura di sterilizzazione del Miroclav C sui virus patogeni per l'uomo. Per la popolazione dialitica il problema dell'epatite B e dell'epatite C, risulta sicuramente più stringente rispetto alla popolazione normale. Per il virus B, grazie alla campagna di vaccinazione, è evidente la lenta eradicazione e sempre meno centri dialisi hanno necessità di sezioni contumaciali. Per il virus C, scoperto più recentemente non esiste ancora un vaccino e trova nelle trasfusioni di sangue il più alto rischio di contagio. L'incidenza risulta più elevata nella popolazione emodialitica rispetto alla omologa popolazione sottoposta a dialisi peritoneale, questo indica che è il trattamento in se che porta ad un rischio maggiore di infezione da Virus C.

Survey su Efficacia della procedura di sterilizzazione del Miroclav su Virus parenterali (tab.4)
- Sono stati scelti per il test il Cytomegalovirus e il Poliovirus
- I Virus capsulati come il CMV, l'HBV e l'HCV sono meno resistenti dei virus nudi come PLV e il virus dell'epatite A

Cytomegalovirus	capsulato, dsDNA
Virus B dell'epatite	capsulato, dsDNA
Poliovirus	nudo, ssRNA
Virus C dell'epatite	capsulato, dsDNA
G. Enders Istituto di Virologia di Stoccarda 1998	

Efficacia della sterilizzazione a vapore: Virucida (tab.5)		
<i>Inattivazione del CMV</i>	Prima Autoclave	Dopo Autoclave
Tubo	IEA/ml	IEA/ml
1	1,1x10 <sup>5</sup>	0
2	7,3x10 <sup>4</sup>	0
3	7,3x10 <sup>4</sup>	
4	8,3x10 <sup>4</sup>	0
<i>Inattivazione del Poliovirus</i>	Prima Autoclave	Dopo Autoclave
Tubo	pfu/ml	pfu/ml
1	4,3x10 <sup>6</sup>	0
2	4,0x10 <sup>6</sup>	0
3	3,0x10 <sup>6</sup>	0
4	3,3x10 <sup>6</sup>	0

Per lo studio sono stati scelti come agenti virali inquinanti il Citomegalovirus (CMV) e il Poliovirus (PLV) (vedi tabella 4), la ragione per cui non sono stati utilizzati sperimentalmente il virus B e C è legata alla difficoltà di ottenere un siero con elevate titolazioni e alla difficoltà di quantificare al termine della procedura di sterilizzazione la presenza di virus con potere infettante, infatti i virus B e C sono generalmente testati con il sistema della Polimerase Chain Reaction che è capace di rilevare anche piccolissimi frammenti del virus ma non discrimina tra infettanti e non. Inoltre il CMV è un virus capsulato proprio come l'HCV e l'HBV, mentre il PLV è nudo come il virus dell'epatite A che come noto è molto più resistente dei primi due. Come si può osservare dalla tabella 5, è evidente la capacità di inattivare i virus da parte della procedura di sterilizzazione della Miroclav C.

### Il problema del biofilm

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 il materiale organico, da qui il termine biofilm (1,2,3,5). Tale materiale organico è composto principalmente da microorganismi vivi e in decomposizione, il glicocalice che le avviluppa cattura elementi nutritivi e fornisce una barriera contro la penetrazione degli agenti disinfettanti. Un lavoro pubblicato recentemente condotta su 3 diverse apparecchiature, con alle spalle differenti ore di lavoro, mostra come la presenza del biofilm non è evidenziata dalla semplice indagine batteriologica (vedi Tabella 6), o endotossinica. Solo attraverso uno specifico sistema sperimentale, che prevedeva il sezionamento dei tubi in vari punti del circuito e rimozione dello strato di biofilm con metodologia ad ultrasuoni, è stato possibile quantificare la presenza di contaminazioni da biofilm. In particolare è stato evidenziato la presenza di una notevole concentrazione di batteri totali rispetto a quelli vivi. Dunque le comuni procedure di disinfezione sono capaci di uccidere i microorganismi ma non di rimuovere il biofilm.

(tab.6)

Campioni	Macchina 1 10732 h		Macchina 18194 h		Macchina 3 - 19192 h	
	cfu/ml	Batteri Totali	cfu/ml	Batteri Totali	cfu/ml	Batteri Totali
Tubo Acqua	32	2x10 <sup>5</sup>	22	2x10 <sup>5</sup>	15	1x10 <sup>4</sup>
Tubo bicarbonato	21	6x10 <sup>4</sup>	18	4x10 <sup>5</sup>	11	1x10 <sup>3</sup>
Tubo dialisato	10	9x10 <sup>4</sup>	14	8x10 <sup>5</sup>	12	7x10 <sup>4</sup>
Liquido di dialisi	0	0	0	0	0	0

A conferma di questo studio si è proceduto a verificare l'efficacia di alcuni disinfettanti nella rimozione di queste formazioni organiche. In un tubo in silicone è stato creato artificialmente un biofilm con *Pseudomonas Aeruginosa*, quindi, dopo essere stato alloggiato nella parte post filtro di un'apparecchiatura dialitica, è stato sottoposto a diverse procedure di disinfezione chimica. Le varie procedure e disinfettanti hanno evidenziato l'inefficacia nella rimozione del biofilm, solo la disincrostazione seguita da autoclave lo ha totalmente rimosso. I dati mostrano che l'eradicazione del biofilm è garantita sia da un'accurata detersione con un disincrostante unitamente a sterilizzazione a vapor saturo ad un flusso di 700 ml/min, la sinergia dell'azione chimica, termica e fisica è capace di distruggere le formazioni minerali, uccidere i microrganismi e rimuovere il materiale organico. Le problematiche inerenti il controllo della qualità del dialisato sono molteplici e coinvolgono tanti settori differenti: le tecnologie costruttive, le procedure di controllo delle infezioni nonché le metodologie di controllo, in quest'ambito la figura del tecnico può rappresentare un elemento centrale soprattutto in qualità di supervisore.