

LA STÉRILISATION






I. INTRODUCTION

La stérilisation est le fait de **priver** un objet ou un produit des **micro-organismes qui le souillent**. On doit adapter la méthode au produit et il est possible de les associer.

/ATTENTION Il faut toujours réaliser la stérilisation à **l'intérieur** du conditionnement et dans une zone à atmosphère contrôlée ! +++

L'efficacité de la stérilisation dépend du **degré initial de contamination microbienne**, on va donc utiliser une matière peu contaminée initialement pour plus d'efficacité.

Nous retrouvons différentes méthodes de stérilisation :

-  Stérilisation par la chaleur (chaleur humide, chaleur sèche)
-  Stérilisation par gaz alkylants
-  Stérilisation par irradiations
-  Filtration stérilisante
-  Stérilisation par gaz plasma

II. LES TÉMOINS DE STÉRILISATION

Ils permettent de vérifier **l'efficacité de la stérilisation** : il faut vérifier la **température et la durée**.

1. Les témoins physico-chimiques

Ce sont des **substances** qui témoignent du passage par la phase de stérilisation.

On retrouve plusieurs indices de passage :

ξ Changement de couleur par rapport au point de fusion

Ex : acide benzoïque qui possède une température de fusion à 121°C

ξ Indicateur coloré

Ex : éosine passant du rose pâle au orangé

Les méthodes que l'ont utilise ont des **caractéristiques différentes** pour témoigner du passage par la phase de stérilisation :

ξ Chaleur humide : bande thermosensible avec un changement de couleur **au contact de la vapeur d'eau**

ξ Chaleur sèche : bande thermosensible avec un changement de couleur au **point de fusion**

ξ Par rayonnement : pastilles PVC imprégnées d'un indicateur coloré

ξ Par gaz plasma : changement de couleur en présence de **peroxyde d'hydrogène**

2. Les témoins biologiques

Ce sont des témoins qui permettent de vérifier la **réduction de 6log** d'une population après traitement stérilisant.

Pour chaque indicateur, il faut connaître le **N0** (nombre initial de germes présents) et le **DT** (temps de réduction décimal).

En fonction de la méthode, nous n'utiliserons pas la même souche pour vérifier si la stérilisation a été efficace :

- Chaleur sèche : Bacillus subtilus
- Chaleur humide : Bacillus stearothermophilus
- Par oxyde d'éthylène : Bacillus subtilus var. Niger
- Par rayonnement : Bacillus pumilus

Ces souches n'ont pas été choisies au hasard, ce sont les **souches les plus résistantes** pour le traitement donné.

RECAP : bien différencier témoins biologiques (permettent de vérifier la réduction de 6log après stérilisation) et physico-chimiques (substance qui témoigne du passage par la stérilisation) +++

III. STÉRILISATION PAR LA CHALEUR

C'est une **méthode de choix** si le produit la supporte car c'est la méthode la plus efficace et la plus sûre.

La sensibilité des microorganismes à la chaleur dépend :

- De l'espèce microbienne
- De la forme
- De la durée du traitement
- Du nombre de germes avant traitement (=N0)
- De la température
- Du milieu de développement des germes (l'abondance en eau favorise le dvp des germes alors que dans un milieu lipophile on aura moins de chances de dvp des germes)

1. Les espèces microbiennes

Leur sensibilité à la chaleur dépend de l'espèce considérée. On apprécie cette méthode par l'utilisation **d'espèces très résistantes à la température** (voir les différentes souches dans les témoins biologiques).

Il faut aussi savoir que **les spores sont beaucoup plus résistantes** que les formes végétatives pour une même espèce (spores = forme de résistance).
Donc le moyen de stérilisation utilisé devra non seulement détruire les formes végétatives mais aussi les spores.

2. Durée et nombre de germes

La stérilisation suit une **loi décroissante** du nombre de microorganismes en fonction du temps à température constante.
Le nombre de germes survivant est inverse à la durée du traitement.
Logique, plus vous traitez longtemps le produit moins il y a de risque qu'il reste des germes à la fin.

On peut donc prendre en compte la formule suivante : $\log(N/N_0) = -kt$
avec N0 : nombre initial de germes présents (vaut 10^6)

N : nombre de germes à l'instant t

DT : temps de réduction décimale

Cette formule n'est pas à apprendre, retenez seulement que le nombre de germes survivant est une fonction inverse de la durée du traitement.

> Le temps de réduction décimale :

A une température donnée, DT correspond au **temps nécessaire** pour réduire la population de microorganismes d'un **facteur 10 soit 1log**. Donc après un temps DT, on a **10 fois moins** de bactéries qu'au départ.

Le DT est **constant** pour une souche donnée. Pour le Bacillus stearothermophilus (utilisé pour la chaleur humide) le **DT = 1min30/2min**.

Pour une **stérilisation efficace**, il faut une décroissance d'au minimum **10^6** soit 6log par rapport à la contamination initiale.

Donc 2min (DT du *Bacillus stearothermophilus*) $\times 6$ (car pour une stérilisation efficace il faut une décroissance de 10^6) = 12min , on rajoute une marge de sécurité de 3min .

+++ La stérilisation à la chaleur humide doit alors durer 15min à 121°C .

> La valeur d'inactivation thermique Z :

C'est l'**élévation de température** nécessaire pour réduire la valeur de DT d'un facteur 10. Plus la température du traitement est élevée, plus le DT diminue.

Pour *Bacillus stearothermophilus*, $Z = 10^\circ\text{C}$. Donc pour une élévation de 10°C (soit 131°C), le DT est divisé par 10 et ne vaut plus que $0,2\text{min}$ soit 12s .

> Le temps équivalent FT :

C'est le temps nécessaire pour obtenir le **même effet** qu'un temps défini à la température de référence. Ce paramètre permet de comparer des traitements thermiques différents.

Ex : 1min à 121°C équivaut à 2min à 118°C .

Cela veut dire que si l'appareil varie simplement de quelques degrés, on va doubler ou tripler le temps nécessaire pour avoir le même résultat de stérilisation.

> La valeur stérilisatrice F_{2T} :

C'est la **somme des effets stérilisants** sur l'ensemble du cycle de stérilisation. Elle permet de vérifier si la stérilisation a été efficace ou non.

Ex pour la chaleur humide : Quand $Z = 10^\circ\text{C}$ et que la $T = 121^\circ\text{C}$, la valeur stérilisatrice est notée F_0 et permet la comparaison de l'efficacité de traitements différents.

F_0 doit être au minimum de **8min** pour que la stérilisation soit dite efficace. C'est l'équivalent d'une stérilisation pour laquelle il y aurait eu une décroissance de $8\log$ donc de 10^8 pour des spores très résistants.

On peut dire qu'une stérilisation où $F_0 = 35\text{min}$ est acceptable. Mais on ne peut pas dire qu'elle est acceptable si $F_0 = 4\text{min}$. J'espère que vous avez compris, c'est parceque on dit que F_0 doit être au minimum de 8min .

Le but de la stérilisation est d'obtenir une probabilité de non stérilité de 10^{-6} .

Le niveau **assurance stérilité minimal** de 10^{-6} se traduit donc par une réduction de $6\log$ de la contamination microbienne de départ.

3. Stérilisation par chaleur humide

C'est une **méthode de choix** de par son efficacité, l'innocuité de son procédé (ce n'est que de l'eau transformée en vapeur), ses températures relativement basses (120°C ; 140°C).

Il va y avoir une maîtrise des moyens de contrôle :

- Qualité de l'eau : traitée pour éviter impuretés et entartrage
- Qualité de la vapeur : purger le système pour éviter poches d'air
- Le titre de vapeur saturée doit être de 99% (poids vapeur/poids eau liquide), cela veut dire que la vapeur doit rester à l'état gazeux pour assurer la stérilisation.
- Pureté chimique de l'eau : pas de traces de graisses, de particules métalliques.

Un cycle de stérilisation à la chaleur humide est composé de **4 phases** :

- Phase de vide : élimination de l'air
- Phase plateau :
 121°C pendant 15 min
 ou 134°C pendant 10 min
- Refroidissement
- Séchage

Avantages : facilité d'utilisation du matériel, innocuité agent stérilisant

Inconvénients : attention objets thermosensibles, attention objets sensibles à l'oxydation.

Applications : **surtout les médicaments**, matériel médico-chirurgical acier inoxydable, verre, latex

4. Stérilisation par chaleur sèche

C'est une technique utilisant de l'**air chaud à pression atmosphérique**, en étuve.

Il va y avoir plusieurs étapes lors de la stérilisation par chaleur sèche :

- A **180°C pendant 30min** pour la stérilisation des contenants en verre dans le cadre des procédés de fabrication aseptique
- A **220°C pour la dépyrogénisation** des contenants en verre (ampoules, flacons p.p.i.)

Le temps pour atteindre la température de stérilisation est plus long à cause de la faible conductivité thermique de l'air.

Applications : pour objets métalliques et récipients verre p.p.i., mais **pas pour les médicaments.**

IV. FILTRATION STÉRILISANTE

C'est une technique de stérilisation qui s'applique aux **fluides** (gaz, liquides monophasiques).

Cette technique est utilisée pour les solutions ayant un **principe actif thermolabile**.

Le filtre est choisi et il doit :

- ✿ être **compatible** avec le PA dissous
- ✿ avoir un **faible taux de rétention** du PA
- ✿ avoir un diamètre des pores de **0,22µm** pour assurer la stérilisation
- ✿ Mécanismes : Criblage, impact inertiel, adsorption

Les paramètres importants sont :

- ♦ La nature du filtre (cellulose, nylon, polypropylène)
- ♦ Sa porosité
- ♦ Son seuil de rétention
- ♦ La perte de charge

L'efficacité de la filtration est confirmée avec une **suspension de microorganismes vivants** de petite taille qui sera elle aussi filtrée.

Le témoin biologique de référence est *Pseudomonas diminuta* (0,3µm).

Le filtrat ne doit pas donner de développement microbien dans un milieu approprié sinon cela veut dire que le filtre est endommagé.

V. STÉRILISATION PAR DES AGENTS CHIMIQUES

1. Le formaldéhyde

Cette technique consiste en l'**évaporation du formaldéhyde** liquide sous forme de monomères gazeux. La pénétration de ces monomères est **lente et faible** et crée une alkylation et une dénaturation des protéines.

Cette technique peut poser des problèmes car les monomères peuvent se **polymériser** et ainsi **diminuer l'efficacité** de la stérilisation.

Le formaldéhyde n'agit qu'en présence de **vapeur d'eau et à 50°C**.

Un système détection du gaz (qui est irritant, toxique) n'est pas nécessaire car une fuite serait directement détectable du fait de son odeur caractéristique.

Inconvénients : faible pénétration, maîtrise difficile des paramètres de stérilisation, polymérisation des monomères (=baisse de l'efficacité), corrosion du matériel, irritant pour la peau et l'appareil respiratoire.

Applications : stérilisation des surfaces, mais **absolument pas pour les médicaments.**

2. L'oxyde d'éthylène

L'OE est un gaz **inodore, très réactif, inflammable, explosif** si $3\% < C^\circ < 83\%$.

Pour abaisser le risque d'explosion, on le mélange avec un gaz inerte comme le **N₂ ou le CO₂**.

Ce gaz agit par alkylation et intervient donc dans le métabolisme microbien. Il a une **excellente pénétration** au sein des solides poreux.

Lui aussi nécessite une certaine humidité pour pouvoir agir.

Paramètres d'efficacité :

- ♦ Concentration en OE dépend de la température, de la nature de l'objet, du temps contact
- ♦ Température : entre 37 et 60°C ++ (donc **PAS à température ambiante**)
- ♦ Humidité relative : permet la diffusion de l'OE à travers les membranes des germes, favorise l'alkylation et la transformation des formes sporulées en formes végétatives (moins résistantes)
- ♦ Durée d'exposition : dépend de la concentration en OE et de la température, détermine la qualité de la stérilisation

Avantages : bonne diffusibilité

Inconvénients : toxicité, désorption lente (difficile de faire sortir le gaz du matériau à stériliser), polyéthylènes → relargage rapide et latex → relargage lent, formation de dérivés toxiques si ajout **H₂O ou Cl** (éthylène chlorhydrine, éthylène glycol), seuil olfactif haut (explose avant repérage donc nécessité d'un système de détection), matériel sensible à la chaleur

Applications : stérilisation des médicaments s'il n'y a aucune autre méthode possible, du matériel médico-chirurgical, du matériel à usage unique.

VI. STÉRILISATION PAR LES RAYONNEMENTS IONISANTS (RI)

Cette technique entraîne la formation de **radicaux libres instables** qui vont oxyder les membranes des bactéries (peroxydation lipidique) pour les éliminer. Il y a une **action cumulative et proportionnelle à la dose**.

Le mécanisme est celui de la radiolyse de l'eau contenue dans les microorganismes.

On a 2 sources irradiantes : **⁶⁰Co (cobalt) et ¹³⁷Cs (césium)**.

La dose absorbée dépend :

- De l'activité et configuration de la source
- De la distance de la source au produit
- Du temps d'exposition et du nombre de passages devant la source
- De la nature du produit, sa composition, densité, de son conditionnement

Les rayons gamma sont les plus utilisés car ils sont les plus pénétrants. L'énergie apportée doit être **inférieure à 5 MeV** pour ne pas créer de radioactivité induite.

Avantages : pouvoir de pénétration importante, on peut donc facilement stériliser du matériel à travers son emballage étanche commercialisé, procédé fiable et reproductible, stérilisation à froid

Inconvénients : modifications possibles des propriétés physico-chimiques des médicaments ou matériaux

Contrôles : répartition des rayonnements et leur intensité : les dosimètres sont des intégrateurs ce qui fait qu'on peut mesurer la densité optique des dosimètres et la variation de densité optique est proportionnelle à la dose absorbée

Applications : médicaments avec radio-stérilisation, antibiotiques à risque d'hydrolyse (non stérilisables par chaleur humide), matériel médico-chirurgical, greffons osseux.

Un sel ou un ester est moins sensible que l'acide libre à la radiolyse, les médicaments solides sont plus stables aux rayonnements ionisants.

VII. STÉRILISATION PAR LE PLASMA

Un cycle de stérilisation par plasma est composé de 5 phases :

- ✿ Phase de vide
- ✿ Injection de peroxyde d'hydrogène
- ✿ Diffusion du peroxyde d'hydrogène
- ✿ Phase plasma (= gaz ionisé)
- ✿ Retour à la pression atmosphérique

Les éléments constitutifs du plasma sont transportés en flux continu vers la chambre de stérilisation pendant toute la phase plasma.

C'est une stérilisation à basse température, réalisée par combinaison des effets du peroxyde d'hydrogène et du plasma. **Son témoin biologique est *Bacillus circulans*.**

Le gaz ou le mélange de gaz n'a **pas d'effet sporicide** tant qu'il n'est pas activé (= tant qu'il n'est pas à l'état de plasma). La durée de vie des espèces du plasma est très courte.

Caractéristiques :

- Durée inférieure à celle de la stérilisation sèche ou humide
- Température < oxyde éthylène (**55°C**)
- Possibilité de traiter la plus grande gamme d'objets possible
- Absence de risque pour opérateurs, patients, matériel dans des conditions normales d'utilisation

Intérêt : matériel thermosensible comme ceux en plastique, certaines fibres optiques (fibroscopes).