

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

+++ La stérilisation à la chaleur humide doit alors durer  $15\text{min}$  à  $121^\circ\text{C}$ .

### > 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  $10^\circ\text{C}$  (soit  $131^\circ\text{C}$ ), le  $DT$  est divisé par 10 et ne vaut plus que  $0,2\text{min}$  soit  $12\text{s}$ .

### > 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 :  $1\text{min}$  à  $121^\circ\text{C}$  équivaut à  $2\text{min}$  à  $118^\circ\text{C}$ .

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<sub>2T</sub> :

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 parce que on dit que  $F_0$  doit être au minimum de  $8\text{min}$ .

**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 ( $120^\circ\text{C}$  ;  $140^\circ\text{C}$ ).

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 :  
      $121^\circ\text{C}$  pendant 15 min  
     ou  $134^\circ\text{C}$  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 **H<sub>2</sub>O 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 : **<sup>60</sup>Co (cobalt) et <sup>137</sup>Cs (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).