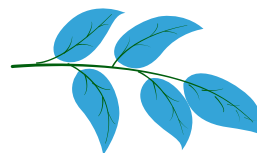


## Stérilisation



La stérilisation a pour but de **priver un objet ou un produit des microorganismes qui le souillent**. +++ La méthode doit être adaptée au produit, il est possible d'associer plusieurs méthodes pour plus d'efficacité (solide, liquide, **thermolabile**, sensible aux rayonnements...). L'efficacité de la stérilisation dépend du degré initial de contamination microbienne (+ contaminé = + difficile à stériliser), on commence le processus avec la matière la moins contaminée possible !

♥ Méthode adaptée au produit : par exemple une solution aqueuse vraie de viscosité très basse : on peut faire une filtration stérilisante, si le PA est sensible à la chaleur on ne va pas le chauffer. Mais si on a une émulsion, on ne pourra pas la filtrer, les gouttelettes de l'émulsion sont trop grandes et vont rester sur le filtre. Un principe actif sous forme de poudre ne pourra pas être filtré, mais on pourra utiliser des rayonnements.

Il faut toujours réaliser, si possible, la stérilisation à l'intérieur du conditionnement (ce qui évite des manipulations à risque de contamination)

La stérilisation se fait en zone à atmosphère contrôlée, pour éviter de polluer les produits avec notre atmosphère.

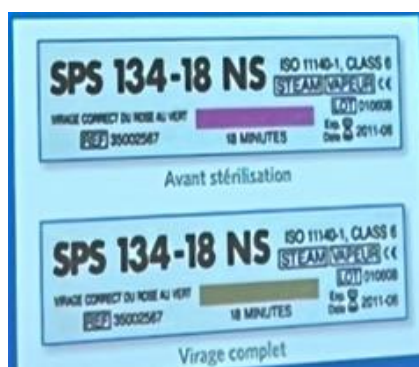
Il existe plusieurs modes de stérilisation (*détaillées plus bas*) :

- Stérilisation par chaleur humide ou sèche (physique température)
- par irradiation (physique rayonnements),
- par filtration stérilisante (mécanique)
- par gaz alkylants = stérilisation chimique gaz
- par gaz plasma = « qui sont de la physique et de la chimie mais surtout de la chimie » = gaz ionisé

♥ L'assurance stérilité de  $10^{-6}$  c'est-à-dire qu'en prenant  $10^6$  bactéries, sur lesquelles on applique un procédé de stérilisation, pour que cette stérilisation soit efficace, il faut qu'à la fin il y ait au moins une décroissance de 6 log : soit une unité non stérile sur 1million d'unités stérilisées (en théorie zéro). Bien sûr en pratique on n'a pas forcément 1million de bactéries sur notre produit, l'idée justement c'est qu'on en aura logiquement moins et donc qu'on arrivera bien à zéro bactéries à la fin, d'où l'intérêt de limiter la contamination initiale.

### 1 - Les témoins de la stérilisation

Ils permettent de vérifier, d'affirmer l'efficacité de la stérilisation, en vérifiant la température ou la durée de la phase de stérilisation.



Ce qu'on faisait avant : l'acide benzoïque a son point de fusion à 121°C, or on préconise pour la chaleur humide une température à 121°C. Avec l'exemple de ces bandelettes, en mettant de l'acide benzoïque avec de l'éosine, l'acide benzoïque chauffe et se transforme, le pH change et donc l'éosine change de couleur (rose => rose orangé) ce qui confirme qu'on a atteint 121°C, mais on n'a pas d'indication concernant le temps

Pour l'irradiation, ces pastilles ont collées sur l'emballage du médicament ou du dispositif médical. On va l'irradier : elle passe du jaune au rouge lorsqu'elle a été exposée aux rayons gamma.

Les indicateurs de passage sont des indicateurs physico-chimiques de stérilisation qui sont placés sur chaque emballage de matériel à stériliser et qui peuvent être lus immédiatement après la stérilisation.

Utilisation de moniteurs physiques, des sondes embarquées (=intégrateurs) qui recueillent beaucoup plus d'informations : température, pression, temps. Elles sont autonomes, qu'on peut placer par exemple dans l'autoclave pour récupérer ces informations à la fin de la stérilisation.



Norme EN 554 (fixe conditions de température, pression et temps)  
sondes embarquées  
et thermocouples



- A. Les témoins physico-chimiques

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

Parmi les indices de passage par la phase de stérilisation, on retrouve :

- ➔ Changement de couleur par rapport au point de fusion (*ex : Acide benzoïque qui possède une température de fusion à 121°C + Eosine passant du rose pâle à l'orangé selon le pH*)
- ➔ Chaleur humide : bande thermosensible avec un changement de couleur au contact de la vapeur d'eau
- ➔ Chaleur sèche : bande thermosensible avec un changement de couleur au point de fusion
- ➔ Par rayonnement : pastille PVC imprégnées d'un indicateur coloré.
- ➔ Par gaz plasma : bande adhésive, changement de couleur lors du contact avec le peroxyde d'hydrogène
- ➔ Indicateurs multi paramètres : qui prennent en compte l'agent stérilisant + durée de traitement + concentration de gaz ou dose de rayon
- ➔ Indicateur « Bowie- Dick » : disque thermosensible utilisé pour vérifier l'efficacité du prétraitement dans les autoclaves à vapeur d'eau (*présent sur le diapo mais pas abordé à l'oral*)

Les méthodes de stérilisation ont des méthodes différentes pour témoigner du passage par la phase de stérilisation.

- B. Les témoins biologiques

Ce sont des témoins qui permettent de vérifier la **réduction de 6log (=10<sup>6</sup>)** d'une population après traitement stérilisant.

Pour chaque indicateur il faut connaître le **NO** (nombre initial de germes présents) pour vérifier la population après traitement stérilisant et le **DT** le temps de réduction décimal. En fonction de la méthode de stérilisation nous n'utiliserons pas la même souche pour vérifier si la stérilisation a été efficace (*et je vous ai mis des petits mémos pour tout retenir*)

- ➔ Chaleur sèche : **Bacillus subtilis** (*la même lettre 's' au début*)
- ➔ ♥ Chaleur humide : **GEOBacillus stearothermophilus** ou Bacillus géostéarothermophilus (*thermo comme température, chaleur sèche déjà prise donc chaleur humide*) (*=> nouveau nom parce que la classification de la bactérie a changé...mais bon il a dit un nom à l'oral, l'autre vient du diapo, on va essayer de lui poser la question pour savoir lequel retenir*)
- ➔ Par oxyde d'éthylène (gaz alkylant) : **Bacillus subtilis var. Niger**
- ➔ Par rayonnement : **Bacillus pumilus** (*rayonnement = cancer, cancer du poumon -> pumilus*)

- ➔ Par filtration stérilisante : ***Pseudomonas diminuta*** (filtration, on diminue ce qui peut passer à travers le filtre donc diminuta)
- ➔ Par gaz plasma : ***Bacillus circulans*** (plasma du sang, le sang circule = circulans)

Ces souches ne sont pas choisies au hasard, ce sont les souches les plus résistantes pour le traitement donné.

## 2 - 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 micro-organismes à la chaleur dépend de plusieurs facteurs :

- De l'espèce microbienne
- De la forme (végétative ou sporulée/encapsulée)
- 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 développement des germes, contrairement à un environnement lipophile)

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**. Il faut aussi savoir que les spores sont beaucoup plus résistantes que les formes végétatives pour une même espèce (spores = forme de résistance) -> le moyen de stérilisation devra détruire les formes végétatives et aussi les spores.

Durée et nombre de germes :

La stérilisation suit une loi décroissante du nombre en fonction du temps à température constante.

**Le nombre de germes survivant est inverse à la durée du traitement :  $\log(N/N_0) = -kt$**

N0 : nombre initial de germes présents ( $10^6$ )

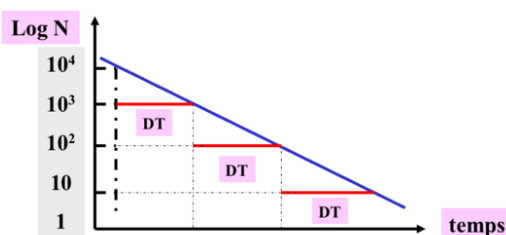
N : nombre de germes à l'instant t

$D_T$  (D indice T): temps de réduction décimale

a. Le temps de réduction décimale  $D_T$

A une température donnée,  $D_T$  correspond au **temps nécessaire** pour réduire la population de micro-organismes d'un facteur 10 soit 1log.

Après  $D_T$ , on a 10 fois moins de micro-organismes qu'au départ. Le  $D_T$  est constant pour une souche donnée : *Bacillus géostearothermophilus* (utilisé pour la chaleur humide)  $D_T = 1\text{min}30/2\text{min}$



Pour une stérilisation efficace, il faut une décroissance d'au minimum  $10^6$  soit 6log par rapport à la contamination initiale.  $D_T \times n(\log) = 2\text{min} \times 6 = 12\text{min}$  au minimum plus 3min de marge de sécurité.

Une stérilisation efficace à la chaleur humide doit durer 15min à  $121^\circ\text{C}$  +++++

b. La valeur inactivateur 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.

Ex : Pour *Bacillus géostearothermophilus*,  $Z = 10^{\circ}\text{C}$  : pour une élévation de  $10^{\circ}\text{C}$  ( $\rightarrow 131^{\circ}\text{C}$ ) alors le DT est divisé par 10 donc 0,2min soit 12s (*en théorie*)

c. 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  $121^{\circ}\text{C} \Leftrightarrow$  2min à  $118^{\circ}\text{C}$

Si la température varie même très peu, on va doubler ou tripler le temps nécessaire pour avoir le même résultat de stérilisation. Il faut donc faire attention à la précision de la température.

d. La valeur stérilisatrice  $F_{21}$ 

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 (= la qualité de la stérilisation)

Pour la **chaleur humide** : quand  $Z = 10^{\circ}\text{C}$  et  $T = 121^{\circ}\text{C}$  la valeur stérilisatrice est notée **F0** et permet la comparaison de l'efficacité de traitements différents.

F0 est le temps équivalent qu'il aurait fallu appliquer au produit si la température de stérilisation était de  $121^{\circ}\text{C}$

F0 doit être au **minimum de 8min** pour que la stérilisation soit dite efficace. C'est l'équivalent d'une stérilisation avec décroissance de 8log pour des spores très résistantes. On peut dire qu'une stérilisation où  $F0 = 35\text{min}$  est acceptable mais  $F0 = 4\text{min}$  n'est pas acceptable. *Tant que c'est supérieur à 8min on est bon*

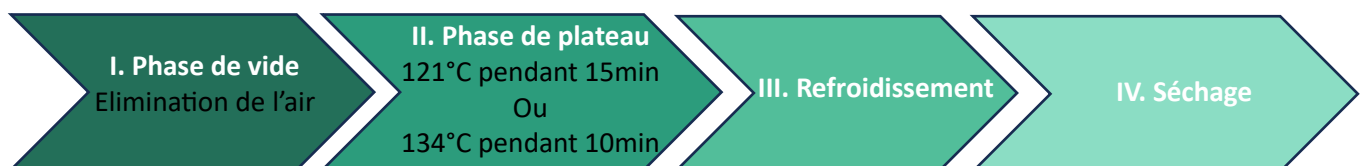
Le but de la stérilisation est d'obtenir une **probabilité de non stérilité de  $10^{-6}$**  soit **une unité non stérile sur 1 million d'unités stérilisées**. +++ Le niveau d'assurance stérilité minimal doit être de  $10^{-6}$  donc une réduction de 6log de la contamination microbienne de départ.

### 3 - Stérilisation par la chaleur humide

Méthode de choix de par son efficacité, innocuité du procédé (vapeur d'eau), températures relativement basses

On a une maîtrise des moyens de contrôle :

- Qualité de l'eau : eau traitée, pour éviter impuretés et entartrage
- Qualité de la vapeur : on purge le système pour éviter les poches d'air (=diminuent efficacité de la stérilisation), le titre de vapeur saturée (poids vapeur/poids eau liquide) doit être de 99%, l'eau doit être 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 (+++) :



Avantages (+) : facilité d'utilisation du matériel, innocuité de l'agent stérilisant

Inconvénients (-) : Attention aux objets/médicaments thermosensibles, ou sensibles à l'oxydation

(->) Applications : Surtout médicaments et matériel médico-chirurgical acier inox, verre, latex

#### 4 - Stérilisation par la chaleur sèche

Utilise de **l'air chaud à pression atmosphérique**, en étuve :

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 PPI)

Inconvénients (-) : Le temps pour atteindre la température de stérilisation est plus long à cause de la faible conductivité thermique de l'air. (*par rapport à la vapeur d'eau*)

(->) Applications : PAS pour les médicaments, uniquement pour les objets métalliques et récipients en verre PPI

#### 5 - Filtration stérilisante

Cette technique s'applique **aux fluides** (gaz et liquides monophasiques => donc pas pour des émulsions ou suspensions +++), utilisée pour les solutions ayant un principe actif **thermolabile**

Le filtre doit :

- Être **compatible** avec le PA dissous
- Avoir un **faible taux de rétention du PA** (le PA ne doit pas rester dans le filtre)
- Avoir un **diamètre des pores de 0,22µm** (jusqu'à 1 µm) 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 stérilisante est confirmée avec une suspension de microorganismes vivants de petite taille qui sera filtrée sur le filtre une fois la filtration du PA effectuée : le filtrat ne doit pas donner de développement microbien dans un milieu approprié (incubation sur gélose) sinon cela veut dire que le filtre est endommagé.

♥ Indicateur spécifique : *Pseudomonas diminuta* (**0,3µm**) ou *Brevundimonas diminuta* (un nouveau changement de classification des bactéries, chouette ! (non))

#### 6 - Stérilisation par des agents chimiques (gaz alkylants)

##### 1. Le formaldéhyde

Cette technique consiste en l'évaporation du formaldéhyde liquide sous forme de monomères gazeux, la **pénétration est lente et faible** et crée une alkylation et une dénaturation des protéines. S'il y a polymérisation, la stérilisation est moins efficace.

**Agit en présence de vapeur d'eau et à 50°C.**

Un système de détection du gaz (qui est irritant et toxique) n'est pas nécessaire car une fuite serait directement détectable du fait de son odeur caractéristique (dès 0,2 ppm)

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

(->) Applications : stérilisation des surfaces, absolument **pas pour les médicaments**

## 2. L'oxyde d'éthylène

L'oxyde d'éthylène est **inodore**, très **réactif**, **inflammable** et **explosif** (si  $3\% < C^0 < 83\%$ ). On le **mélange à un gaz inerte** comme N2 ou CO2 pour abaisser le risque d'explosion. Le gaz agit par **alkylation**, il intervient dans le métabolisme microbien. Il a une très bonne pénétration au sein des solides poreux et **nécessite une certaine humidité** pour agir.

Paramètres d'efficacité :

Concentration en OE dépend de la T°, de l'objet, du temps de contact

- **température** (37-60° donc non ambiante)
- **humidité** relative (sporulées -> végétatives, favorise alkylation, aide à la diffusion à travers membranes)
- **durée** d'exposition (selon concentration, température) 30min à 10h.

Avantages (+) : Bonne **diffusibilité**, **pénétration** au sein des solides poreux

Inconvénients (-) : Toxique, **désorption lente** (sauf Polyéthylène =PET), risque de dérivés toxiques avec H2O et Cl (éthylène chlorhydrine, éthylène glycol =*antigel hyper toxique*), seuil olfactif haut donc mise en place de systèmes de détection, matériel sensible à la chaleur

(->) Applications : Stérilisation des médicaments s'il n'y a aucune autre méthode possible (*c'est pas ton plan B c'est ton plan R*), matos médico-chirurgical à usage unique (à travers l'emballage) -> sonde G-I, urinaire, matériel perfusion, seringues

## 7 - Rayonnements ionisants

Formation de radicaux libres instables qui oxydent les membranes des bactéries (peroxydation lipidique) pour les éliminer.

Il y a une action cumulative et proportionnelle à la dose.

Deux sources irradiantes :  $^{60}\text{Co}$  (Cobalt)  $^{137}\text{Cs}$  (Césium)

La dose absorbée dépend :

- De l'**activité et configuration de la source**
- De la **distance de la source** aux produits
- 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 5MeV** pour ne pas créer de radioactivité induite +++

♥ Formation de **radicaux libres** à partir de H2O, qui vont attaquer les membranes bactériennes en entraînant la mort cellulaire. Les radicaux libres, instables se recombinent en **peroxydes**.

Avantages (+) : Pouvoir de pénétration importante, on peut donc facilement stériliser du matériel à travers son emballage étanche commercialisé. Fiable et reproductible. **A froid**

Inconvénients (-) : Modifications possibles des propriétés physico-chimiques (*couleur, odeur, viscosité = sans dangerosité mais influence la qualité*) des mdc et matériaux

Contrôle qualité : **répartition** des rayonnements et leur intensité : les **dosimètres** sont des intégrateurs (bandes de plexiglas qui s'assombrissent selon les effets des rayonnements) : on mesure la densité optique, proportionnelle à la dose absorbée

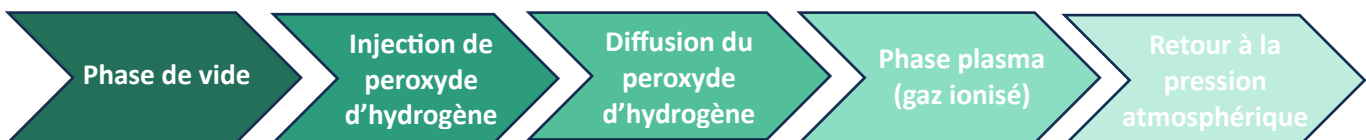
(->) Applications : médicaments avec **radio-stérilisation** (*qui contiennent peu/pas d'eau*) (decapeptyl, tétracycline, néomycine = pommade ophtalmique), **antibiotiques à risque d'hydrolyse**, matériel médico-chirurgical, greffons osseux

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

## 8 - Stérilisation par le plasma

*Cette méthode n'est pas très courante mais est en train de se développer*

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



Le peroxyde d'hydrogène en gaz plasma est composé d'atomes d'oxygène et d'hydrogène, de l'oxygène excité, des radicaux libres  $H^\circ$  et  $OH^\circ$  : gaz hautement ionisé = état plasma. Ces éléments constitutifs de plasma sont transportés en **flux continu** vers la chambre de stérilisation pendant toute la phase plasma : la durée de vie des espèces du plasma est très courte.

La stérilisation par exposition aux espèces issues d'une décharge gazeuse pour du matériel spécifique.

C'est une stérilisation à **basse température**, réalisée par combinaison des effets du peroxyde d'hydrogène et du plasma. 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)

Caractéristiques :

- Durée inférieure à celle de la stérilisation par la chaleur (sèche ou humide)
- Température < pour l'oxyde d'éthylène (55°C)
- Possibilité de traiter la **plus grande gamme d'objets** possible.
- Absence de risque pour les opérateurs, le patient, le matériel en conditions normales

(->) Applications : Matériel thermosensible comme ceux en plastique, certaines fibres optiques (fibroscopes)



- J'ai signalé les additions par rapport à l'ancien cours avec des petits cœurs ♥
- Bon courage, on approche de la fin, tiens bon jusqu'au bout !!!