

## PRINCIPI E TECNICHE DI STERILIZZAZIONE

### Generalità

- La **sterilizzazione** è attuata attraverso tecniche fisiche o chimiche che consentono di uccidere (o rimuovere in alcuni casi) organismi viventi, compresi i virus eventualmente presenti nel materiale da sterilizzare;
- la **disinfezione** si ottiene con l'uso di sostanze chimiche ad azione germicida, garantisce la non infettività di un materiale, ma non la distruzione di tutti i microrganismi presenti. È importante sottolineare che con la sterilizzazione non si ottiene l'apirogenicità del preparato, poiché non vengono rimosse le cellule microbiche o i loro prodotti (endotossine, ecc.).

La sterilizzazione può essere ottenuta mediante calore (fiamma diretta, calore umido, vapore, calore secco), filtrazione, radiazioni, gas.

### Sterilizzazione mediante calore

#### Fiamma diretta

Per fiamma diretta si utilizza il **becco Bunsen**; viene utilizzata per sterilizzare anse di platino (o nichelcromo), ma anche per l'**incenerimento** del materiale. Una semplice sterilizzazione (**flambaggio**) è richiesta per operazioni in asepsi in apertura e chiusura delle provette e dei recipienti; si ottiene mediante passaggio rapido sulla fiamma dell'orlo delle provette che devono essere accuratamente richiuse successivamente.

#### Calore umido

La sterilizzazione mediante calore umido è molto efficace perché consente di uccidere i microrganismi a temperature inferiori a quelle che si devono raggiungere con il calore secco; ciò si può spiegare in base alla maggiore conducibilità termica dell'acqua o del vapore, rispetto all'aria secca.

La sterilizzazione mediante calore umido può essere attuata con diversi metodi basati sull'azione di:

- **liquidi caldi** (come acqua): bollitura, pastorizzazione;
- **vapore fluente o sotto pressione**: sterilizzazione con vapore fluente, sterilizzazione frazionata o tindalizzazione, autoclave.

#### 1. Bollitura

Si ottiene utilizzando liquidi portati alla temperatura di **100°C**; permette la distruzione di microrganismi in forma vegetativa e, con un'azione prolungata, anche di alcune spore batteriche.

#### 2. Pastorizzazione (inventata da Pasteur)

Si conoscono due metodi di pastorizzazione:

- **Low temperature long time (LTLT)** detta pastorizzazione lenta, è ottenuta riscaldando il materiale in grossi recipienti alla temperatura di **62,8°C per 30 min.**
- **High temperature short time (HTST)** detta pastorizzazione rapida, è ottenuta facendo passare attraverso piastre che riscaldano il materiale liquido alla temperatura di **75°C per 15-20 sec** e successivamente si procede al rapido raffreddamento.

La pastorizzazione non è un vero e proprio metodo di sterilizzazione, viene applicato soprattutto per la **riduzione della carica microbica** ad es. nella bonifica del latte: consente di uccidere i comuni patogeni (batteri della tubercolosi, Salmonelle, Streptococchi, Brucelle, Rickettsie) e alcuni germi ambientali presenti nel latte, determinando la riduzione del **90-99%** della carica batterica totale.



### 3. Sterilizzazione mediante vapore fluente

Per vapore fluente si intende il vapore acqueo che si forma a pressione atmosferica ordinaria alla temperatura di 100°C. Il vapore possiede un grande potere di penetrazione e può uccidere tutte le forme vegetative e molte forme sporali: in alcune occasioni può avere azione sterilizzante. Un sistema utilizzato per formare vapore fluente è la **pentola di Koch**.

È un recipiente metallico di forma cilindrica rivestito da materiale isolante; nell'interno, a livello del quarto inferiore, è posta una griglia che sostiene gli oggetti da sterilizzare. Il cilindro non è chiuso ermeticamente e un termometro indica la temperatura raggiunta nel suo interno. L'acqua, portata all'ebollizione, forma vapore che man mano sostituisce l'aria presente, fino ad ottenere vapore saturo.

La sterilizzazione a 100°C prevede il trattamento per **3 volte**.

### 4. Sterilizzazione frazionata (Tindalizzazione)

Si applica quando il materiale da sterilizzare non sopporta le temperature superiori a 100°C (ad esempio terreni contenenti proteine del latte, siero, ecc.). In particolari casi la tindalizzazione si effettua a temperature inferiori a 100°C in apparecchi utilizzati anche per la solidificazione del terreno: esempio di questo apparecchio è il **gelatinizzatore di Koch**.

Il materiale viene sottoposto ad un **primo riscaldamento per 30 min-1h**, successivamente si procede al raffreddamento fino a temperatura ambiente; dopo **24h** si sottopone il materiale ad un **secondo riscaldamento per 30 min-1h**, allo scopo di uccidere le eventuali forme vegetative che si sono formate dalla germinazione delle spore durante l'intervallo di 24h. Dopo **24h** (a temperatura ambiente) dal secondo riscaldamento, si opera un **terzo riscaldamento per 30 min-1h**, per avere la certezza che tutte le forme microbiche siano state uccise.

### 5. Sterilizzazione mediante vapore sotto pressione

In campo microbiologico si utilizza soprattutto per la sterilizzazione di materiale che non subisce alterazioni da parte della temperatura.

L'**autoclave** è una particolare pentola a pressione; l'azione sterilizzante è data dalle alte temperature raggiunte dal vapore saturo sotto pressione. Esiste una stretta corrispondenza tra i valori della pressione e della temperatura ad esempio: una temperatura di **120,6°C** corrisponde ad una pressione di **1 atm.** e permette la sterilizzazione del materiale in un tempo di **15-30 min**; generalmente si fa riferimento alla distruzione delle spore batteriche, le più termostabili tra le forme viventi conosciute.

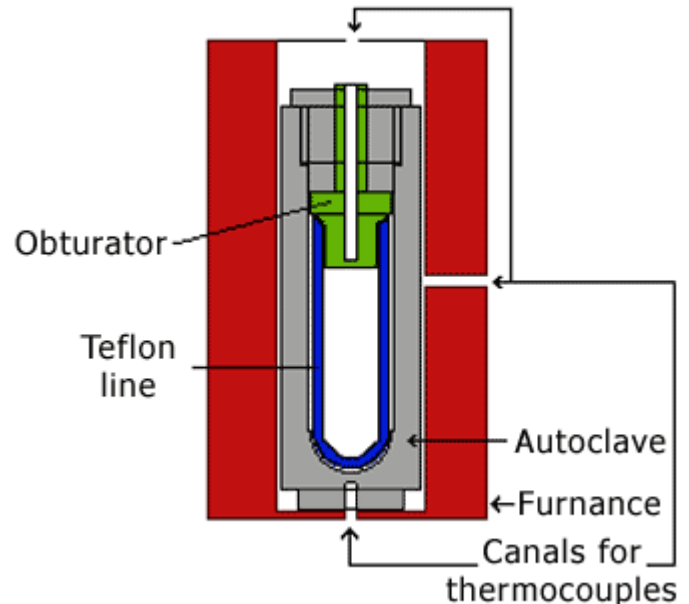
La sterilizzazione avviene perché il calore induce la coagulazione del protoplasma microbico (con denaturazione delle proteine); si è osservato che tale processo è molto rapido poiché il vapore aumenta la conducibilità termica e garantisce una maggiore penetrazione del calore.



- Il materiale da sterilizzare deve essere disposto adeguatamente nella camera di sterilizzazione per evitare che in alcuni punti la temperatura non raggiunga i valori richiesti;
- la chiusura dei recipienti deve essere ottenuta con tappi di cotone o con tappi a vite o di plastica; questi ultimi non devono essere a chiusura ermetica, in modo che l'aria presente nel liquido possa uscire liberamente;

- i recipienti non devono essere riempiti fino all'orlo in modo che il liquido non fuoriesca a causa dell'ebollizione che si raggiunge durante la caduta di pressione;
- il vapore saturo deve sostituire l'aria presente nella camera di sterilizzazione;
- controllare la corrispondenza tra pressione e temperatura;
- la temperatura e il tempo di sterilizzazione devono essere adeguatamente regolati, allo scopo di permettere al vapore di penetrare nei materiali da sterilizzare. Di solito sono sufficienti, in campo microbiologico, **11-15 min a 121°C** per distruggere le endospore dei batteri;
- la temperatura di sterilizzazione deve essere costante per tutto il tempo di sterilizzazione (eventualmente controllarla con registratori di temperatura);
- a sterilizzazione avvenuta, per aprire l'autoclave, aspettare che la pressione abbia raggiunto i livelli normali e la temperatura sia scesa al di sotto dei 100°C;

**NB:** il **controllo di efficienza** (di sterilità) si ottiene disponendo in autoclave una sospensione di **spore di Bacillus subtilis** (tra le più resistenti) e facendo avvenire un ciclo di sterilizzazione; in seguito la sospensione si semina su terreno di coltura per valutare l'assenza di sviluppo microbico e avere quindi la certezza di avvenuta sterilizzazione (metodo biologico).



### Calore secco

La sterilizzazione con calore secco si ottiene in stufe come il **forno di Pasteur** (stufa a secco), mediante aria calda ottenuta con opportuni generatori di calore; le stufe devono essere provviste di sistemi di circolazione dell'aria per ottenere uniformità di temperatura nei vari scomparti. La sterilizzazione si ottiene regolando la temperatura a **160-170°C** per **1-2h**; questa è la temperatura alla quale vengono uccise le spore microbiche. Il forno di Pasteur si utilizza soprattutto per la sterilizzazione di vetreria, strumenti e materiale resistente alle alte temperature e al calore, non per terreni di coltura.

### Sterilizzazione per filtrazione

La filtrazione si applica per la sterilizzazione di materiale liquido contenente componenti labili al calore (vitamine, antibiotici, proteine del siero, ecc.).

Si ottiene facendo passare il materiale da sterilizzare attraverso una membrana provvista di pori il cui diametro (**0,45 micron**, alcuni 0,2micron) deve essere di dimensioni tali da permettere liberamente al liquido di attraversarlo, ma non ai batteri.

Con la filtrazione le tossine ed i virus presenti nel materiale liquido non vengono rimossi, questo perché le dimensioni della particella virale le consentono di attraversare i pori della membrana filtrante.

## Sterilizzazione con radiazioni

La sterilizzazione mediante radiazioni è applicata per alcuni prodotti farmaceutici e prodotti per uso di laboratorio come capsule petri, pipette, ecc.

Le radiazioni, per avere effetto sterilizzante apprezzabile, devono essere impiegate ad una lunghezza d'onda inferiore a **300nm**. Ad esempio, la sterilizzazione mediante irradiazione con **luce ultravioletta** (290nm), non è applicabile in tutti i campi a causa del basso potere di penetrazione; si può utilizzare per ridurre la carica batterica in luoghi affollati, corsie d'ospedale, camere operatorie, tenendo sempre presente l'effetto nocivo di tali radiazioni sull'uomo (danno grave a livello della cornea).

Le radiazioni ionizzanti più utilizzate sono:

- le **gamma**, ottenute mediante emissione da una sorgente di **cobalto 60** o di **cesio 139**;
- i **raggi X** sebbene questi ultimi non possono essere impiegati per la sterilizzazione degli alimenti, a causa delle possibili alterazioni organolettiche.

## Sterilizzazione con gas

Il gas si utilizza per la sterilizzazione di materiale non resistente al calore e , soprattutto, per materiale in plastica monouso (siringhe, piastre petri, ecc.). L'agente sterilizzante è l'**ossido di etilene** usato al **10%** in combinazione con **anidride carbonica al 90%** o con **freon**, in modo da ridurre l'inflammabilità o la possibilità di esplosioni. Si è dimostrato che l'ossido di etilene è tossico per batteri, spore microbiche, funghi e virus. La sterilizzazione, definita anche sterilizzazione a freddo, si ottiene in contenitori simili ad autoclavi dove il materiale da sterilizzare viene sottoposto, in presenza di ossido di etilene, a temperature non superiori a **55°C** per tempi variabili tra le **4h** e le **8h** in presenza di umidità.

A sterilizzazione avvenuta è necessario allontanare i residui di ossido di etilene mediante areazione. L'ossido di etilene può interagire con alcuni componenti dei terreni colturali e con alcune plastiche e quindi non è applicabile in maniera generalizzata.