

## il D-value: un parametro che si rivela fondamentale per la corretta scelta e per l'ottimale utilizzo degli indicatori biologici nel controllo dei processi di sterilizzazione.

Il D-value rappresenta la resistenza di un particolare microrganismo nei confronti del processo di sterilizzazione. Esso è definito come il tempo necessario, a precise condizioni, per ridurre di 1 logaritmo, o del 90%, la popolazione iniziale di spore.

La resistenza al processo di sterilizzazione dipende da alcuni fattori tra i quali vi sono le caratteristiche delle spore utilizzate, il metodo scelto per la sterilizzazione ed il mezzo, o il supporto, con cui le spore sono veicolate.

Nel caso in cui le spore prendano diretto contatto con il prodotto, poi, vi è un altro fattore da considerare: la sua composizione chimica. Ad esempio, la presenza di cloruro di sodio e di potassio fa aumentare la resistenza termica di *Bacillus stearothermophilus* e lo stesso effetto producono gli ioni bivalenti, come il magnesio o il calcio, sulla resistenza di *Bacillus coagulans*, o gli ioni potassio su *Clostridium sporogenes*. Infine, quando le spore vengono inoculate direttamente su superfici solide, quali il vetro o la gomma, la loro microstruttura può sicuramente influenzare il D-value.

Di seguito ci concentreremo soprattutto sui vari aspetti della sterilizzazione a vapore. In Tabella 1 sono riportati i D-value medi di alcuni microrganismi appartenenti ai generi *Bacillus* e *Clostridium*, che comprendono i microrganismi considerati più resistenti alla sterilizzazione con vapore.

**Tabella 1**

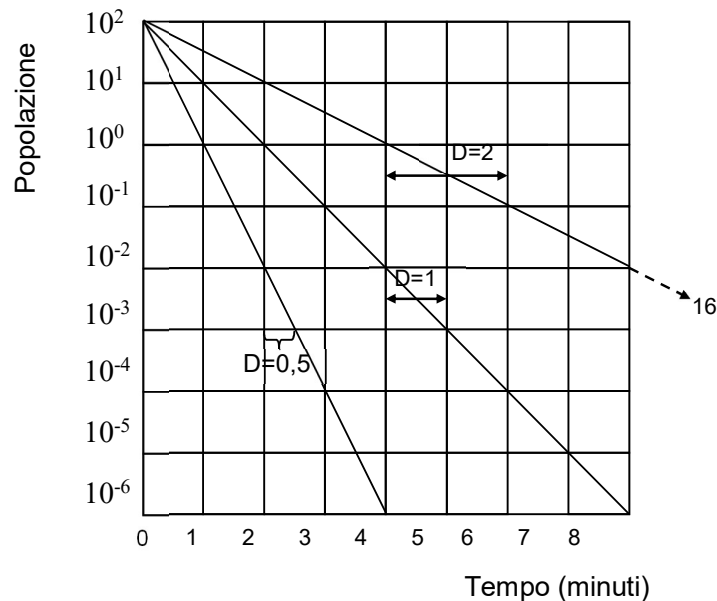
| <b>D-value medi di alcuni microrganismi resistenti</b> |                           |
|--|---------------------------|
| Microrganismo  | D <sub>121</sub> (minuti) |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i>                     | 2,0                       |
| <i>Bacillus subtilis</i>                               | 0,5                       |

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| <i>Bacillus megaterium</i>      | 0,04    |
| <i>Bacillus cereus</i>          | 0,007   |
| <i>Clostridium botulinum</i>    | 0,2     |
| <i>Clostridium sporogenes</i>   | 0,8-1,4 |
| <i>Clostridium histolyticum</i> | 0,01    |

Per le specie batteriche più usate, il D-value a 121°C oscilla, generalmente, tra 0,5 e 2 minuti. E' quindi evidente che il risultato del controllo della sterilizzazione ad una temperatura costante può essere molto differente in dipendenza del D-value della specie batterica impiegata.

Il Grafico 1 mostra come, partendo da una popolazione iniziale di  $10^2$  spore, si raggiunga una contaminazione residua di  $10^{-6}$  spore in 4, 8 o 16 minuti secondo il D-value.

**Grafico 1**



Per rappresentare l'abbattimento delle spore si usa un grafico semi-logaritmico in cui sull'asse delle y si trova la popolazione mentre sull'asse delle x vi è il tempo, ciò permette di visualizzare come, ad ogni intervallo di durata pari al D-value, si abbia la medesima riduzione del numero di spore. Ad esempio, nel caso in cui il D-value sia pari a 1 minuto, applicando 1 minuto delle condizioni di sterilizzazione avremo un abbattimento da  $10^2$  a  $10^1$  spore (riduzione=1 logaritmo), applicando 2 minuti di processo avremo un abbattimento da  $10^2$  a  $10^0$  spore (riduzione=2 logaritmi), applicando 3 minuti di processo avremo un abbattimento da  $10^2$  a  $10^{-1}$  spore (riduzione=3 logaritmi) e così via.

## Calcolo del D-value

La resistenza termica degli indicatori biologici viene determinata dal produttore con l'ausilio di un particolare sterilizzatore, il cosiddetto BIER vessel, che consente di applicare un ciclo di sterilizzazione con tempi di riscaldamento e raffreddamento estremamente brevi. Si tratta di uno strumento indispensabile per poter verificare il D-value in condizioni simili a quelle applicate dal produttore.

Di seguito tratteremo, in modo dettagliato, due tra i diversi metodi utilizzati per calcolare il D-value: il metodo della Frazione Negativa (o Most Probable Number, secondo Spearman-Karber) e il metodo della Curva di Sopravvivenza (Survivor Curve Method).

### **Metodo della Frazione Negativa**

Questo metodo fornisce una stima del tempo occorrente per raggiungere la sterilità. Esso consiste nell'esporre un certo numero di indicatori biologici all'agente sterilizzante e nel verificare la loro progressiva inattivazione. Gli indicatori biologici vengono suddivisi in gruppi (non meno di 7 gruppi, con almeno 20 indicatori per gruppo) ognuno dei quali è esposto al processo di sterilizzazione per un diverso tempo. Le esposizioni hanno durata graduale (es. 10, 11, 12,...minuti). Alla fine dell'esposizione bisogna controllare, seguendo le condizioni di coltura consigliate dal fornitore, se vi è stato accrescimento batterico. E' necessario che il risultato includa almeno:

- 1 gruppo di indicatori tutti positivi (con crescita batterica);
- 4 gruppi con indicatori sia positivi che negativi;
- 2 gruppi di indicatori tutti negativi (non mostrano crescita batterica).

Di seguito è riportato un esempio pratico dei calcoli matematici che devono essere eseguiti per determinare il D-value. In Tabella 2 sono raccolti i dati necessari.

**Tabella 2**

| Esposizione N° | Tempo di esposizione |                | N° indicatori esposti |           | N° indicatori negativi |           |
|----------------|----------------------|----------------|-----------------------|-----------|------------------------|-----------|
|                | t                    | durata         | n                     | esposti   | r                      | negativi  |
| 1              | t <sub>1</sub>       | 10 min.        | n <sub>1</sub>        | 20        | r <sub>1</sub>         | 0         |
| 2              | t <sub>2</sub>       | 11 min.        | n <sub>2</sub>        | 20        | r <sub>2</sub>         | 2         |
| 3              | t <sub>3</sub>       | 12 min.        | n <sub>3</sub>        | 20        | r <sub>3</sub>         | 8         |
| 4              | t <sub>4</sub>       | 13 min.        | n <sub>4</sub>        | 20        | r <sub>4</sub>         | 12        |
| 5              | t <sub>5</sub>       | 14 min.        | n <sub>5</sub>        | 20        | r <sub>5</sub>         | 15        |
| →6             | t <sub>6</sub>       | <b>15 min.</b> | n <sub>6</sub>        | <b>20</b> | r <sub>6</sub>         | <b>20</b> |
| 7              | t <sub>7</sub>       | 16 min.        | n <sub>7</sub>        | 20        | r <sub>7</sub>         | 20        |

Il calcolo del D-value si svolge secondo la formula seguente:

$$D = \frac{U}{0,2507 + \log N}$$

dove: N = popolazione iniziale di spore (Es.  $1,7 \times 10^6$  spore)

U = tempo medio necessario ad ottenere la sterilità

$$U = t_6 - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \times \sum_{i=6}^{i=1} r_i = 15 - \frac{1}{2} - \frac{1}{20} \times 57 = 11,65$$

dove:  $t_6$  = primo tempo di esposizione in corrispondenza del quale gli indicatori sono tutti negativi (nell'esempio  $t_6=15$  minuti)

- d = intervallo di tempo tra le esposizioni, se esso è costante (Es. d=1 minuto)
- n = numero di indicatori per ogni esposizione, se esso è costante (Es. n=20)
- $r_i$  = numero di indicatori negativi all'esposizione N° i.

Il D-value quindi è:  $D = \frac{11,65}{0,2507 + \log (1,7 \times 10^6)} = \frac{11,65}{6,48} = 1,8$  minuti

### Metodo della Curva di Sopravvivenza

Il metodo consiste nel sottoporre un determinato numero di indicatori biologici a condizioni graduali di esposizione all'agente sterilizzante.

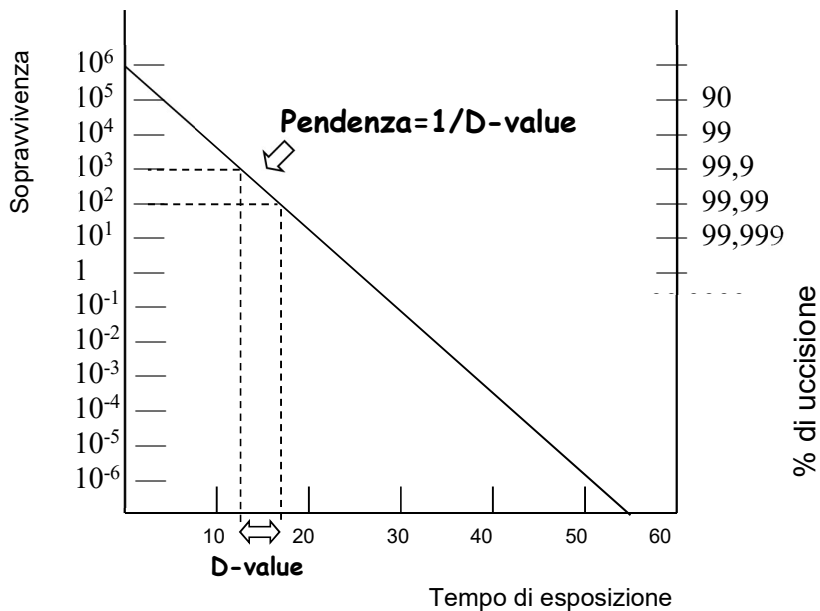
Devono essere eseguite almeno 5 diverse prove, che differiscono tra loro per intervalli di tempo costanti, e che devono includere:

- una prova in cui il campione non è esposto all'agente sterilizzante;
- la riduzione della popolazione di spore a non più dello 0,01% della popolazione originale, con almeno una prova eseguita.

Per ogni prova deve essere utilizzata la stessa quantità di indicatori biologici ed in numero minimo di 4 unità.

Il test consiste nell'espore gli indicatori al processo di sterilizzazione e, al termine di questo, nel trasferirli in acqua distillata sterile per rimuovere le spore mediante sonicazione, triturazione o altri metodi validati. Il numero delle spore sopravvissute va determinato precisamente seguendo le condizioni di coltura consigliate dal produttore.

I dati raccolti, poi, devono essere inseriti in un grafico che sull'asse delle y ha il logaritmo della popolazione sopravvissuta mentre sull'asse delle x il tempo, espresso in minuti (vedi Grafico 2). Si procede, quindi, alla determinazione della migliore retta dei minimi quadrati. Poiché la linearità deve essere mantenuta entro limiti accettabili, il coefficiente di correlazione della curva non deve essere inferiore a 0,80. Infine, il D-value in minuti si ottiene calcolando il reciproco della pendenza della retta.



**Grafico 2**

L'uso del metodo della Curva di Sopravvivenza, con la conta diretta delle spore, permette di determinare la resistenza per popolazioni sopravvissute maggiori di  $5 \times 10^1$  spore, mentre il metodo della Frazione Negativa, che dà una stima della sterilità, stabilisce la resistenza per popolazioni inferiori a  $5 \times 10^0$ .

La determinazione del D-value in laboratorio si rende necessaria nei seguenti casi:

- per la conferma del D-value dichiarato degli indicatori biologici usati nel controllo della sterilizzazione. Il valore calcolato deve essere compreso nel  $\pm 20\%$  del valore dichiarato;
- per stabilire il D-value degli indicatori biologici allestiti in proprio mediante inoculazione del materiale da sterilizzare;
- per la caratterizzazione di microrganismi resistenti.

Il certificato di analisi, che accompagna ogni lotto di indicatori biologici, riporta le seguenti informazioni relative alla resistenza termica:

- il D-value in minuti, espresso con un decimale dopo la virgola e calcolato a precise condizioni.

Il produttore è tenuto ad indicare il D-value con un'accuratezza di  $\pm 0,2$  minuti;

- il metodo che il produttore ha utilizzato per calcolare il D-value;
- che il D-value è riproducibile solo nelle esatte condizioni in cui il produttore lo ha determinato.

Il D-value dichiarato deve rientrare, per richiesta delle diverse farmacopee, entro specifici limiti.