

Aprile 2018

NUMERO 7

UN INDICATORE BIOLOGICO POSITIVO E'INDICATIVO DI FALLIMENTO DEL CICLO? NON SEMPRE.

Recentemente, un cliente che usa come indicatore biologico lo Spore Ampules SA1-50-06, ha espresso la sua preoccupazione nell'usare un lotto i quali parametri erano **una popolazione di spore di 1.3×10^6** e il **D_{121} -value di 1.9 minuti.**

Il survival time empirico e il kill time empirico (di F_0) erano rispettivamente 10.0 e 15.0 minuti. I tempi calcolati di kill time e di survival time erano 7.8 e 19.3 minuti. Il ciclo di sterilizzazione è stato convalidato per un F_0 di **15.0** minuti.



La sua preoccupazione era quella di ottenere dei falsi positivi nelle varie prove di sterilizzazione. Ha ritenuto che la resistenza dell' IB era troppo grande per il loro tipo di ciclo.

La USP 27 dichiara che gli indicatori biologici usati per controllare i cicli di sterilizzazione a vapore dovrebbero avere una popolazione di spore che va da 10^4 a 10^9 . Nello stesso documento, nella sezione generale <1035> viene dichiarato che un IB adatto per la sterilizzazione a vapore dovrebbe avere un D_{121} -value fra 1.5 e 3.0 minuti. La ISO 11138-3, inoltre dichiara che il D_{121} -value non deve essere meno di 1.5 minuti e la popolazione non deve essere minore di 10^5 .

Fatte tutte queste precisazioni, la scelta adeguata di un IB per il processo di sterilizzazione a vapore dovrebbe essere semplice, giusto? ... Errato. La scelta di un IB può essere un processo relativamente semplice se si capisce che la sua funzione è quella di confermare i dati che vengono generati dalle misurazioni di parametri fisici durante il ciclo quotidiano. L'IB è, in effetti, l'unico vero indicatore

di mortalità del ciclo e, se usato correttamente, dimostrerà che la mortalità biologica corrisponderà ad un valore di F_m misurato e calibrato dalle termocoppie.

Inoltre gli IB positivi non sono sempre indicativi di fallimento del ciclo, a meno che i dati di riduzione logaritmica non indichino una riduzione di parametri di letalità stabiliti durante lo sviluppo del ciclo; il concetto che sarà discusso sotto.

I cicli di sterilizzazione correttamente sviluppati sono stati convalidati per dare una dose specifica di mortalità, equivalente al valore F. Una volta valutato il bioburden del prodotto da sottoporre alla sterilizzazione, il valore di F viene determinato sulla base della mortalità necessaria per inattivare questo bioburden e del livello di SAL desiderato. In assenza di analisi del bioburden, oppure nei casi in cui i prodotti non sono suscettibili a degradazione termica, è comune presupporre lo sviluppo di un ciclo che fornirà dodici riduzioni logaritmiche di un agente inquinante ad un D_{121} -value di 1.0 minuto.

Usando le caratteristiche dell'lo Spore Ampules citate sopra, possiamo costruire la seguente tabella che descrive la sua cinetica di mortalità. Per definizione, una riduzione logaritmica (SLR) di spore vive è realizzata con ogni esposizione incrementale pari a 1.9 minuti, a 121°C.

A	B	C	D	E	F
Exposure Lethality (Fo)	SLRs Achieved *	Remaining Viable Spore Population per Ampules	Log10 of remaining viable spore population**	Value in column C Expressed in numerical format	# of positive spore ampules units expected per 10 exposed units
0.0	0	1.3×10^6	6,114	1,300,000	10
1,9	1	1.3×10^5	5,114	130,00	10
3,8	2	1.3×10^4	4,114	13,00	10
5,7	3	1.3×10^3	3,114	1,3	10
7,6	4	1.3×10^2	2,114	130	10
9,5	5	1.3×10^1	1,114	13,00	10
11,4	6	1.3×10^0	0,114	1,3†	~7
13,3	7	1.3×10^{-1}	-0,886	0,13††	~1
15,2	8	1.3×10^{-2}	-1,886	0,013‡	0
17,1	9	1.3×10^{-3}	-2,886	0,0013§	0
19.0	10	1.3×10^{-4}	-3,886	0,00013	0

Popolazione iniziale di spore per ampolla = $1,3 \times 10^6$

D-value = 1,9 minuti

† A questo livello di letalità c'è il 73% di possibilità che qualche unità di IB sia positivo

†† A questo livello di letalità c'è il 12% di possibilità che qualche unità di IB sia positivo

‡ A questo livello di letalità c'è il 1,3% di possibilità che qualche unità di IB sia positivo

§ A questo livello di letalità c'è il 0,13% di possibilità che qualche unità di IB sia positivo

Come detto in precedenza, il ciclo convalidato è stato sviluppato per un valore di F di 15,0 minuti. Questo valore viene diviso con il D₁₂₁-value pari a 1,9 minuti per calcolare l' SLR che sarà reso da F₀ 15,0.

Per cui:

$$15,0 \div 1,9 = 7,895 \text{ SLR.}$$

Il Log₁₀ della popolazione di spore iniziale è:

$$\text{Log}_{10} 1.3 \times 10^6 = 6.114.$$

$$\text{SRL} = \text{Log}_{10}N_0 + \text{Log}_{10}\text{SAL}$$

$$\text{Log}_{10}\text{SAL} = 10^{-x} = -X$$

$$-X = \text{SLR} - \text{Log}_{10}N_0$$

$$-X = 7,895 - 6,114 = + 1,781$$

$$X = -1,781 \Rightarrow \text{SAL} = 10^{-x} \Rightarrow \text{SAL} = 10^{-1,781}$$

L'inverso del Log₁₀ di -1,781 è:

$$\text{Inv Log}_{10} -1,781 = 0,0166 \text{ che in percentuale è } = 1,66\%$$

Di conseguenza, una volta esposta a F₀= 15.0, un'unità di Spore Ampules con le prestazioni sopra citate di resistenza avrà una probabilità di 1.66% di dare positivi, o meglio, su 60 IB esposti, circa un IB dovrebbe risultare positivo. Se il cliente dovesse usare questo lotto di IB durante la rivalidazione annuale, è molto probabile che tutte le unità di prova esposte potrebbero risultare negative.

Tuttavia, se si presenta un occasionale IB positivo, questo non sarà indice di sterilizzazione fallita; piuttosto, l'IB va a confermare che la mortalità biologica osservata e i risultati ottenuti sono in correlazione con l' F₀=15.0 che è registrato dalle termocoppie.

Per calcolare quanti IB risultano negativi si può usare questa formula:

$$\text{Numero di unità negative} = \frac{\text{Inv del Log naturale del n. di spore sopravvissute per IB}}{100} \times 100$$

per 100 esposti

$$\text{N. di unità negative} \times 100 \text{ esposti} = 100 / \text{Inv Log}_{10} (0,0166) = e^{0.0166}$$

$$\text{N di unità negative} \times 100 \text{ esposti} = 100 / 1,01674 = 98,35 \text{ unità negative su } 100.$$

Al contrario, se si presentano otto unità positive su dieci esposti, questo indicherebbe il fallimento del ciclo. Riferendosi alla suddetta Tabella che per comodità riportiamo qui sotto, si può notare che l' 80% di tasso di sopravvivenza indicherebbe una mortalità appartenente ad un F₀ di circa 11.4 minuti.

Prendiamo il valore $F_0=11,4$ minuti

Ora ci calcoliamo il numero di unità positive per questo F_0 considerando che ci si aspetta 20 unità negative:

$$20 \text{ unità negative} = 100 / \text{Inv Log}_{10} (\text{n.spore sopravvissute})$$

$$100/20 = \text{Inv Log}_{10} (\text{n.spore sopravvissute})$$

$$5 = \text{Inv Log}_{10} (\text{n.spore sopravvissute})$$

$$\text{Log}_{10} 5 = 1.609 \text{ spore sopravvissute} \times \text{IB}$$

$\text{Log}_{10} (1.609) = 0.207$ questo valore viene usato per calcolare l'SLR associato all'80% di IB sopravvissuti e a $F_0=11.4$ minuti

$$\text{SRL} = \text{Log}_{10}N_0 + \text{Log}_{10}\text{SAL}$$

$$\text{Log}_{10}N_0 - \text{SLR} = \text{Log}_{10}\text{SAL}$$

$$6.114 - \text{SLR} = 0.207$$

$$\text{SLR} = 6.114 - 0.207 = 5.907$$

$$\text{SLR} \times D_{121}\text{-value} = F_0$$

$$5.907 \times 1.9 = 11.22 F_0$$

In questo caso, il tasso di sopravvivenza dell' 80% dell'IB sta indicando un F_0 soltanto di 11.8 min. Poichè questo valore è minore di F_0 15.0 che è richiesto nel ciclo convalidato, si confermerebbe il fallimento del ciclo.

Il suddetto esempio illustra come un IB positivo non è sempre indicativo di fallimento del ciclo. Quando si usano gli IB si intercorre a tre risultati potenziali:

- 1) Indicatori biologici tutti positivi,
- 2) Indicatori biologici tutti negativi,
- 3) Alcune unità di IB positive ed alcune unità negative.

La maggior parte degli utilizzatori di IB suppongono che si debba raggiungere sempre il punto 2 per dimostrare la validità del ciclo e l'efficacia della sterilizzazione. Infatti, le informazioni più esatte e più importanti vengono date dal terzo punto, quando si ottengono risultati frazionati. Quando si ottengono i punti 1 o 2, uno sa soltanto se la mortalità è avvenuta o meno, senza avere alcuna indicazione sul processo di mortalità avvenuto durante la fase del ciclo (curva di mortalità). Quando il punto 3 prevale, le informazioni sul processo di mortalità ottenute sono molto specifiche.