

**Sterilizzazione:**

Per effettuare delle analisi, bisogna sterilizzare l'ambiente per impedire che i microorganismi patogeni, influenzino tale processo. La sterilità deve essere mantenuta in ogni procedura, si intende la mancanza di ogni essere vivente.

Metodi: uso di varie procedure (chimiche, fisiche) e portano alla completa distruzione di qualsiasi forma di vita microbica (anche le spore, le più resistenti):

- Mediante calore: uso il calore secco o umido
- Mediante gas: uso ossido di etilene, formaldeide o gas plasma.
- Con le radiazioni: raggi gamma e radiazioni ultraviolette.
- Filtrazione

**CALORE:** È il metodo più affidabile, permette di distruggere gli enzimi e le componenti essenziali per il funzionamento delle cellule. È usato sia per quanto riguarda la procedura con calore umido sia quella con il calore secco. Tale processo di sterilizzazione con l'utilizzo di calore si compone di tre fasi:

1. Riscaldamento: il prodotto è portato a una determinata temperatura.
2. Mantenimento: la temperatura va rispettata ovvero mantenuta tale per un tale di minuti che sono pre impostati (se non avviene il processo non va a buon fine).
3. Raffreddamento

**FIAMMA DIRETTA**

Come avviene= si utilizza il becco bunsen (con la fiamma diretta, oltre che con il calore umido e secco). La fiamma crea un cono di sterilità in quanto a due terzi di altezza raggiunge i 1400 °C ed è utilizzata per sterilizzare anse e spatole.

**CALORE UMIDO**

Viene utilizzato per i materiali termo stabili, in microbiologia, in particolare per la sterilizzazione di strumenti (strumenti in vetreria) e terreni di coltura. È un metodo affidabile in quanto i meccanismi di sterilizzazione prevedono la denaturazione e l'idrolisi delle proteine e l'efficacia si esplica con la distruzione delle cellule batteriche.

Per applicare la sterilizzazione con il calore umido si usano degli sterilizzatori a vapore, le autoclavi = apparecchi costituiti da camere di acciaio inox, con capienza che da 400 a 800 L, possono essere poste in orizzontale o in verticale e sono dotate di portelli ermetici con chiusura ermetica mediante manopola.

Funzionamento dell'autoclave: deve essere rimossa completamente l'aria al suo interno (**rimozione dell'aria**: è una fase essenziale in quanto il rapporto tra temperatura e pressione rimane fisso solo in presenza di vapore puro). Infatti, il vapore per poter agire come agente sterilizzante deve fornire in modo efficiente sia l'umidità che il calore al prodotto che deve essere utilizzato. Affinché ciò avvenga si utilizza del vapore saturo ovvero in fase di transizione, perciò in questa condizione quando il vapore entra in contatto con superfici più fredde, provoca una contrazione che fa sì che venga richiamato altro vapore → si ottiene una condensazione// in questa fase si ha la cessione immediata del calore latente alla superficie dell'oggetto. In questo modo il vapore penetra velocemente sia negli oggetti secchi che in quelli porosi.

La rimozione dell'aria è una fase fondamentale perché il rapporto P/T è fisso se l'aria è stata rimossa. In quanto l'autoclave è un contenitore indeformabile, e variando la pressione aumenta la temperatura secondo la legge dei gas perfetti:  $PV = nRT$  (all'aumentare di P, aumenta T → allo scendere della pressione, scenderà anche la temperatura).

**Autoclave**

- ✓ Viene usato il vapore a temperature comprese tra i 115 e i 134 °C. In genere si utilizzano o il ciclo a 121° per 15 minuti (quello più comune in microbiologia) o a 134° a 3 minuti (soprattutto all'interno delle aziende per sterilizzare garze o camici).
- ✓ Modalità di sterilizzazione:
  - Il materiale da sterilizzare deve essere disposto adeguatamente nella camera di sterilizzazione;
  - La chiusura dei recipienti deve essere ottenuta con tappi di cotone, tappi a vite o tappi di plastica;
  - Il vapore sauro deve sostituire l'aria presente nella camera di sterilizzazione;
  - Bisogna controllare la corrispondenza tra pressione e temperatura;
  - La temperatura e il tempo di sterilizzazione devono essere adeguatamente regolati: (nei cestelli forati, se si tratta di liquidi o di terreni, questi non devono essere chiusi ermeticamente o fino all'orlo perché potrebbero spaccarsi o all'apertura schizzare fuori il liquido all'esterno);
  - Dopo la sterilizzazione: per aprire l'autoclave, mi metto al lato della stessa e con il braccio apri il coperchio, bisogna aspettare che la pressione raggiunga i valori normali e che la temperatura sia scesa al di sotto degli 80°C. (non al di sopra di tali valori perché ci possono essere fuoriuscite dalle bottiglie)

**CALORE SECCO**

- \* Dipende da processi di tipo ossidativi che, pertanto, sono meno efficaci dei processi applicati con il calore umido. Essendoci meno efficace bisognerà aumentare le temperature (dal 160° ai 180°) e i tempi (fino a due ore).
- \* Si realizza in un fornello ad aria calda, quale il forno di Pasteur, fornetti ad aria calda costituiti da camere isolate di acciaio inossidabile, con capacità di 250 L e sono avvolte da un involucro più esterno. Dentro contengono delle resistenze che generano calore e sono rivestiti internamente da pannelli forati (in modo tale penetra dentro la camera il calore, diffuso in maniera uniforme con una ventola).
- \* Il calore secco ha una applicazione ristretta alle polveri che non possono essere sterilizzate con il calore umido o per strumenti di metallo e di vetro (vetreria).
- \* Modalità: oggetti avvolti o racchiusi in contenitori chiusi che devono fornire, però l'esposizione al calore e fare in modo che anche gli oggetti posti centralmente non vengano schermati dall'irraggiamento. Per aprire questi sterilizzatori, al T deve scendere sotto i 40° (prima di poter aprirli e prelevare gli oggetti).

**Sterilizzazione mediante gas:**

- > Vengono utilizzati gas chimicamente reattivi che svolgono attività letale ad ampio spettro: questi gas sono: l'ossido di etilene, la formaldeide e il gas plasma.

La formaldeide è un gas meno penetrante perciò si utilizza spesso l'ossido di etilene. Entrambi hanno un effetto antimicrobico, dovuto a processi di alchilazione dei gruppi sulfidrilici, amminici, idrossilici e carbossilici delle proteine e anche a processi degli immuno gruppi degli acidi nucleici. Entrambi, però, sono mutageni e carcinogeni e vanno usati con cautela perché possono provocare irritazione cutanea e irritazioni delle mucose.

- > La sterilizzazione con l'ossido di etilene:
  - è un gas molto esplosivo e per questo viene miscelato con anidride carbonica in percentuale del 10-12%.
  - Viene utilizzato per la sterilizzazione di materiali (che non possono subire altri tipi di sterilizzazione a caldo) perché non resistono al calore, si tratta, infatti, di un sterilizzazione fredda. È tossico per le spore microbiche, i virus, i batteri e i funghi.
  - Si usano contenitori simili alle autoclavi, in particolare sono camere di acciaio inossidabili e ermetiche e sono a prova di esplosione, hanno una capacità che va dai 100 ai 300 L e sono avvolte da un'altra camera esterna, una "camicia", in cui fluisce all'interno l'aria calda in modo da mantenere la temperatura. Dopo la sterilizzazione bisogna allontanare i residui di gas (perché sono tossici) mediante aereazioni che può avvenire naturalmente lasciando i materiali su scaffali aperti (richiede molti giorni) o con una ventilazione forzata in specifici armati per tempi che vanno dalle 2 alle 24 h.
  - Questa sterilizzazione deve avvenire a vuoto. La T è inferiore a quella con calore secco e umido. Avviene a 55° C in tempi che variano dalle 4 alle 8 h ed è più efficace in presenza di temperatura dal 30-70%.
- > Sterilizzazione con gas-plasma:
  - Processo che residua tossici, alla fine. È meno pericoloso rispetto alla sterilizzazione che avviene con l'ossido di etilene e con la formaldeide.
  - Utilizza l'azione sinergica del perossido d'idrogeno e del gas plasma a bassa temperatura, con lo scopo di distruggere le cellule batteriche.
  - Vengono uniti il gas plasma (che viene generata dall'azione di un forte campo magnetico o elettrico e consiste in una nuvola elettronica di ioni/elettroni/particelle atomiche neutre) che viene in contatto con il perossido di idrogeno che si dissocia in varie specie reattive che collidono con le cellule, uccidendo i micro organismi. Finito di collidere, perdono energie e si ricombinano formando ossigeno e acqua. Tale processo avviene a vuoto, per cui viene immessa aria sterile e dopo aver fatto ciò si può aprire lo sterilizzatore.
  - Prevede 1h a 50 °C.

**Sterilizzazione con radiazioni:**

- ⇒ Utilizzando raggi gamma e radiazioni ultraviolette che hanno sempre come bersaglio il DNA microbico (anche se può essere danneggiata anche la membrana perché il processo di lipo-ossidazione che fa in modo che alcuni acidi grassi diventino idrofili e si formino dei fori sulla membrana.
- ⇒ Vi sono micro organismi sono resistenti alle radiazioni ionizzanti ma tale resistenza diminuisce in presenza di umidità che di ossigeno disciolto, aumentando la temperatura. Quindi, il sistema di sterilizzazione che utilizza le radiazioni sterilizzanti è più efficace in presenza di umidità e di ossigeno.
- ⇒ I raggi gamma: la sterilizzazione con i raggi gamma viene applicata per oggetti allo stato secco (es: plastiche). I raggi gamma vengono derivati da un generatore di cobalto 60 (si trova in forma di palline, alloggiato in colonne di metallo che sono sotto acqua alloggiato in una costruzione di cemento armato → Quando è necessario effettuare il processo di radiazione, queste vanno tirate fuori dall'acqua. La dose di raggi erogata dipende dalla potenza e i tempi di sterilizzazione sono, solitamente lunghi, fino alle 20h.
- ⇒ Radiazioni ultraviolette (UV): hanno un'energia minore rispetto alle radiazioni gamma e, quindi, provocano un danno meno rilevante al DNA microbico. L'azione microbicida si ha con la formazione di polimeri di timina e la morte cellulare avviene quando questo danno chimico è prodotto in modo elevato. Inoltre, queste radiazioni penetrano scarsamente rispetto alle radiazioni gamma perché vengono schermate dal vetro, plastiche e soluzioni dense. Vengono prodotte da lampade a mercurio che hanno una bassa pressione e la lunghezza d'onda ottima è di intorno ai 260 nm. Le lampade sono utilizzate per sterilizzare laboratori dove sono manipolati batteri, virus o culture cellulari, oppure in sala operatoria (sono sul soffitto e vengono accese durante la notte. Possono trovarsi anche sotto le cappe biologiche che servono per sterilizzare il piano di lavoro.

**Sterilizzazione per filtrazione:**

- ✦ È l'unico processo di sterilizzazione che prevede la rimozione meccanica dei micro organismi, piuttosto che alla loro distruzione.
- ✦ Si basa su tre meccanismi: la setacciatura, l'assorbimento e l'intrappolamento.
- ✦ Metodo utilizzato per sterilizzare dei fluidi che contengono sostanze labili al calore. Si sterilizza facendo passare il liquido attraverso una membrana o tramite materiali porosi o granulari, nei cui interstizi passano i fluidi. Sono spesso utilizzati dei filtri non aosa in esteri di cellulosa o policarbonato e si classificano in due grandi gruppi: filtri in profondità (letto di materiale poroso o granulari all'interno dei quali passano i fluidi e vengono intrappolati i microorganismi eventualmente presenti) e filtri di membrana (dischi porosi, fatti di estere di cellulosa o di altri polimeri. I filtri non funzionano per i virus che, a causa delle dimensioni dei pori, riescono a passarli).

Controllo della sterilizzazione: controllare che tali processi siano andati a buon fine, usando sistemi di controllo che possono essere fisici, chimici o biologici (usati singolarmente o in associazione):

1. Controllo fisico:
  - Avviene controllando le temperature o controllando che le autoclavi siano a chiusura ermetica e controllando parametri cui la temperatura e la pressione. (spesso hanno dei registratori che registrano tali informazioni).
2. Controlli chimici: si usano indicatori chimici che controllano vari parametri o su un solo parametro. → le variazioni registrate non corrispondono, per forza, alla sterilità microbiologica. Esempio dello scotch che diventa nero quando ha subito la sterilizzazione.
3. Controlli biologici (Bis): si usano degli indicatori biologici (che danno la certezza della sterilità dopo il processo e che si è ottenuto un prodotto sterile). Sono costituiti da spore batteriche, già inserite in terreno di coltura o già deposte e fatte essiccare su dei supporti tra i quali le ampolle di vetro che contengono un terreno di coltura addizionato con un indicatore di PH che in presenza di un aumento di acidità, porta il terreno ad un netto viraggio di colore (dal viola → al giallo), oppure la striscia di carta che posta sul fondo della provetta contenente spore più resistenti a quel tipo di trattamento e alla fine del processo verranno anch'esse poste in camera calda, se il terreno è torbido la sterilizzazione non è andata a buon fine (se invece rimane limpido, allora sì).

La **sterilizzazione** è un trattamento chimico, termico e gassoso per eliminare ogni forma di vita. Può essere realizzata con:

- Calore secco
- Calore umido
- Filtrazione

Il **calore secco**:

- a) **Aria calda** = la stufa a secco utilizza temperature molto elevate per sterilizzare la vetreria (messa in contenitori metallici o ricoperta con carta di alluminio).
  - 160° per 60 minuti
  - 150° per 120 minuti
  - 140° per 180 minuti
- b) **Flambatura**: con la fiamma del bunsen si può sterilizzare la superficie esterna della provetta. Infatti, la fiamma del bunsen esercita una azione germicida nell'aria intorno alla fiamma per un raggio di circa 10 cm.
- c) **Arroventamento**: con la fiamma si può sterilizzare anche l'ansa e l'ago.

Il **calore umido**:

- a) **Tindalizzazione**
- b) **Vapore sotto pressione** → si usa l'autoclave che unisce l'azione del calore alla pressione.

**Filtrazione:**

- a) **Filtri millipore**: si usa per sostanze che non possono essere sterilizzate a caldo. Si usano filtri porosi di acetato di cellulosa, capaci di trattenere i batteri di grandezza superiore ai loro pori.
- b) **Membrane filtranti**: per filtrare campioni liquidi, in quanto trattengono i batteri in esso presenti.
- c) **Cappa a flusso laminare**: serve per eseguire al suo interno manipolazione microbiologiche per eliminare la contaminazione dei prodotti ma anche dell'operatore e dell'ambiente.

**La cappa a flusso laminare** serve per proteggere l'operatore e l'ambiente dal rischio di contaminazione e permette di lavorare in condizione di sterilità. Il flusso continuo di aria sterile, all'interno della cabina, impedisce la fuoriuscita verso l'esterno di microbi. La sterilizzazione avviene facendo passare l'aria da dei filtri. Bisogna accendere la cappa circa 20 minuti prima per assicurare una completa sterilità al suo interno.

**L'autoclave** viene usata per sterilizzare terreni di coltura, soluzioni acquose e colture di rifiuto. Per effettuare la sterilizzazione, si usa il vapore ad alta pressione, infatti, i microbi si eliminano meglio con il calore umido rispetto che con quello secco, perché il vapore denatura le proteine. Esistono due fattori critici per la riuscita del processo: tutta l'aria deve fuoriuscire dall'autoclave in modo tale che il vapore entri a contatto con la superficie di ciò che deve essere sterilizzato. In caso contrario la temperatura resterebbe più bassa. I materiali non devono essere sigillati, tappi e coperchi devono essere appena avvitati. In tal modo l'aria contenuta al loro interno può uscire liberamente. - il tempo deve essere sufficiente per permettere al vapore di penetrare nei contenitori.

Il **microscopio**:

Strumento capace di fornire una immagine ingrandita di un piccolo oggetto osservato attraverso di esso. È composto da una parte meccanica, l'astivo e da una parte ottica.