



Accord-cadre de coopération internationale entre l'Université Paris Sud (France) et l'Université Félix Houphouët Boigny (Côte d'Ivoire)

## Procédés de stérilisation

Kawthar BOUCHEMAL

Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud

1



Plan du cours

2

1. Introduction
2. La loi cinétique de destruction microbienne
3. Stérilisation par la chaleur
4. Stérilisation par les agents chimiques
5. Stérilisation par des rayonnements
6. La filtration stérilisante



# 1. Introduction



## 1. Introduction

4

### • Définition

- La stérilisation est une opération pharmaceutique qui a pour but de détruire ou d'éliminer « tous » les micro-organismes présents sur un produit ou un objet

### • Quels produits nécessitent une stérilisation?

- Préparations injectables, collyres, médicaments destinés à être appliqués sur des blessures et des brûlures
- Le matériel destiné à recevoir une préparation stérile
- Le matériel chirurgical, les pansements et les fils à ligature
- Le matériel à injection (aiguilles, seringues, cathéters, sondes...)
- Les tubes de recueil de prélèvements
- Stérilisation d'éléments d'un appareillage ou de tuyauterie souillés par les micro-organismes
- Stérilisation de l'air et des surfaces
- Conservation de produits: Maitriser les contaminations qui limitent la qualité des produits finis

**+** 1. Introduction 5

- **Différents procédés de stérilisation**

```
graph LR; A[Stérilisation par la chaleur sèche] --- B{ }; B --- C[Stérilisation par la chaleur humide]; C --- D[Stérilisation par les agents chimiques]; D --- E[Stérilisation par des rayonnements]; E --- F{ }; F --- G[La filtration stérilisante]; B --- H[■ Destruction des micro-organismes]; F --- I[■ Elimination des micro-organismes];
```

Stérilisation par la chaleur sèche

Stérilisation par la chaleur humide

Stérilisation par les agents chimiques

Stérilisation par des rayonnements

La filtration stérilisante

■ Destruction des micro-organismes

■ Elimination des micro-organismes

**+**

## 2. La loi cinétique de destruction microbienne

---

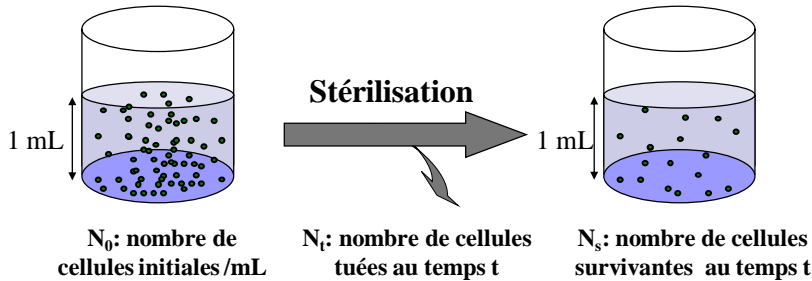
## 2. La loi cinétique de destruction microbienne

7

### • Stérilisation, stérilité

Les procédés de destruction des populations microbiennes suivent dans la plupart des cas une loi **cinétique de premier ordre** qui tient compte des paramètres suivants :

$N_0$	nombre de cellules initiales par millilitre
$N_t$	nombre de cellules tuées par ml au temps $t$
$N_s$	nombre de cellules survivantes par ml au temps $t$
$K$	constante spécifique de mortalité par minute



Le **taux de mortalité** est défini par : 
$$-\frac{dN_s}{dt} = K(N_0 - N_t) = KN_s$$

$K$  augmente considérablement avec la température et peut être déterminé pour une culture pure.

## 2. La loi cinétique de destruction microbienne

8

- Permet de suivre l'évolution **en fonction du temps** de la suspension microbienne homogène d'une seule espèce microbienne dans un milieu stable et lui-même homogène.
- Dans le cas d'une destruction thermique par exemple, la suspension est portée à une température suffisamment élevée pour être létale pour le microbe. La température est maintenue constante pendant la durée de l'expérience.
- Les **micro-organismes survivants sont dénombrés** dans des échantillons prélevés à intervalles de temps donnés et refroidis rapidement afin de limiter les effets de la chaleur.
- La courbe obtenue donne l'évolution de la population microbienne survivante en fonction du temps.

## 2. La loi cinétique de destruction microbienne

9

$$-\frac{dN_s}{dt} = K(N_0 - N_t) = KN_s$$

$N_0$  nombre de cellules initiales par millilitre  
 $N_t$  nombre de cellules tuées au temps  $t$   
 $N_s$  nombre de cellules survivantes au temps  $t$   
 $K$  constante spécifique de mortalité par minute

Si on intègre cette relation entre  $N$  à  $t = 0$  et  $N_s$  au temps  $t$ , on obtient :

$$Kt = \ln \frac{N_0}{N_s}$$

$$\frac{N_0}{N_s} \text{ taux d'inactivation}$$

$$\ln \frac{N_s}{N_0} = -Kt$$

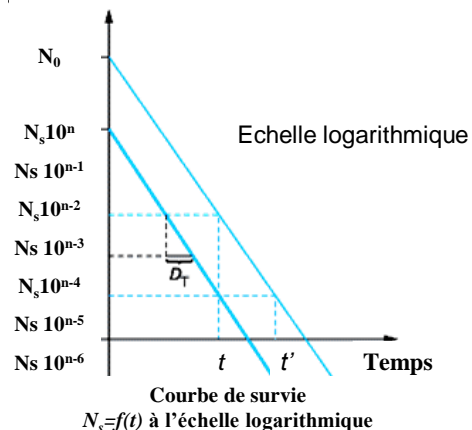
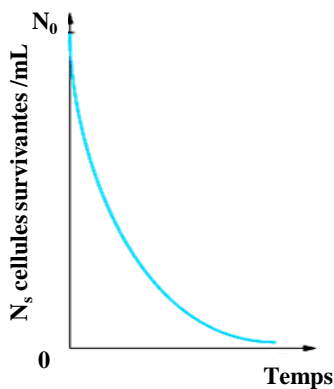
$$\frac{N_s}{N_0} \text{ taux de survie}$$

## 2. La loi cinétique de destruction microbienne

10

- Cinétique du premier ordre
- Courbe qui suit la même allure dans le cas (i) d'une destruction thermique, (ii) d'une destruction par agent chimique ou (iii) d'une destruction par irradiation.

- La **stérilité absolue** n'existe pas (absence totale de micro-organismes).
- La performance de la stérilisation dépend de la quantité initiale des micro-organismes

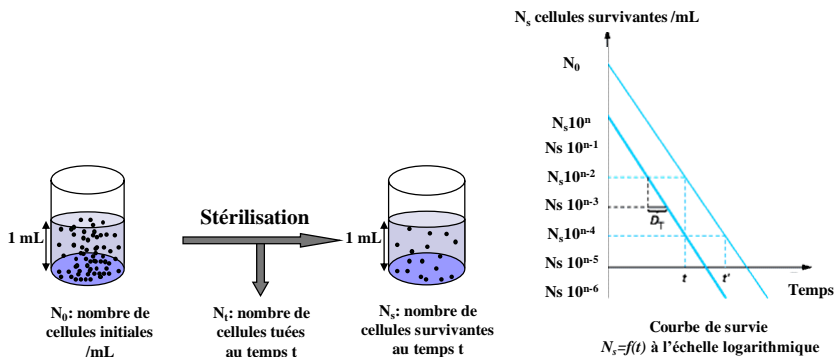


## 2. La loi cinétique de destruction microbienne

11

La courbe de survie est caractérisée par le paramètre  $D_T$

$D_T$  : **temps de réduction décimale**, le temps nécessaire pour réduire 90 % des micro-organismes présents, c'est-à-dire obtenir une réduction décimale ( $N_s = 0,1N_0$ )



## 2. La loi cinétique de destruction microbienne

12

- Les milieux à stériliser sont souvent des systèmes complexes qui ne renferment pas qu'une seule espèce microbienne.
- Les courbes de survie peuvent présenter des allures différentes de celle représentée précédemment.
- Certaines courbes sont **biphasiques** et constituées de deux portions de droite.
- La seconde partie du phénomène correspondant à une **cinétique de destruction plus lente**.



### 3. Stérilisation par la chaleur

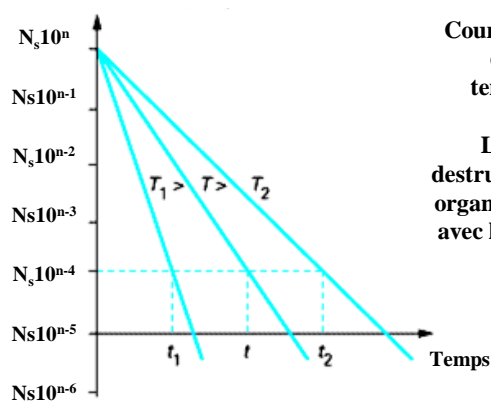


### 3. Stérilisation par la chaleur

14

- ❑ Le produit à stériliser est porté à une température suffisamment élevée pour être létale pour le microbe, et maintenue constante pendant un certain temps.
- ❑ La température influence la valeur de  $D_T$
- ❑ Possibilité de tracer plusieurs courbes de survie à des températures différentes.

Ns cellules survivantes /mL



**Courbes de survie à différentes températures :**

**La vitesse de destruction des micro-organismes augmente avec la température .**

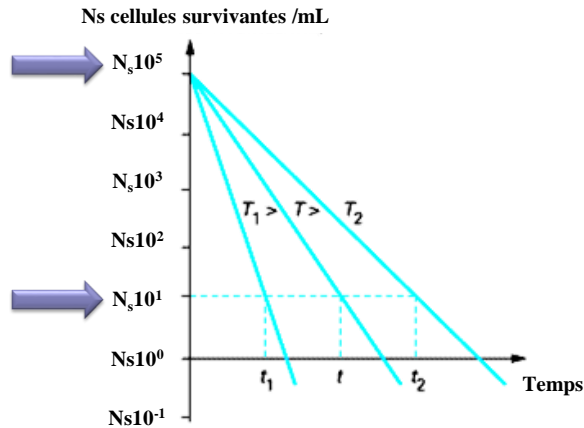
### 3. Stérilisation par la chaleur

15

□ La **quatrième réduction décimale** correspond au passage de  $10^5$  cellules vivantes/mL à 10 cellules/mL: **C'est la valeur stérilisatrice F**

□ Elle est obtenue :

- après un temps  $t_1$  à la température  $T_1$ ,
- après un temps  $t_2$  à la température  $T_2$
- avec  $T_2 < T_1$  et  $t_2 > t_1$ .



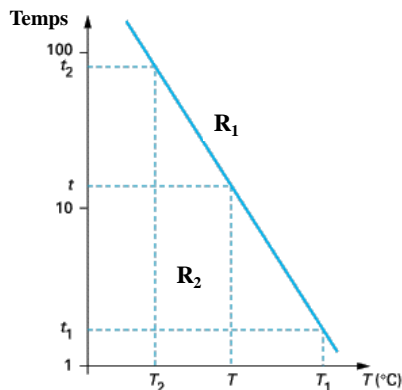
### 3. Stérilisation par la chaleur

16

□ **Relation température-temps :**

□ La courbe logarithmique des temps nécessaires pour obtenir une quatrième réduction décimale de la population microbienne en fonction de la température est une droite qui traduit la relation température-temps de quatrième réduction décimale de la population microbienne considérée ( $TRT_4$ ).

□ Chaque point de cette droite correspond à un **couple température-temps** permettant d'obtenir la quatrième réduction décimale de la population microbienne testée.



**Relation température-temps de quatrième réduction décimale ( $TRT_4$ )**

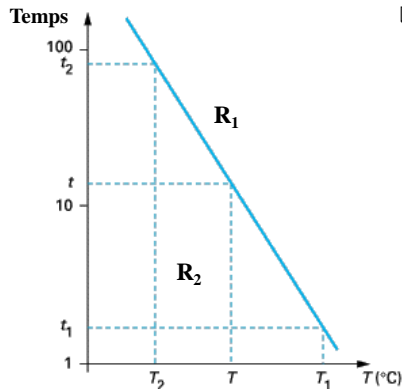


### 3. Stérilisation par la chaleur

17

#### ☐ Relation température-temps :

- ☐ Zone  $R_1$  : les couples température-temps provoquent un effet destructeur supérieur à quatre réductions décimales.
- ☐ Zone  $R_2$  : les points correspondent à des couples température-temps qui ne permettent pas d'obtenir la quatrième réduction décimale de la population testée.



- ☐ Les points correspondant à des couples température-temps permettant d'obtenir **les autres réductions décimales** de la population microbienne appartiennent donc à des droites parallèles à celle représentée.

### 3. Stérilisation par la chaleur

18

- La droite correspondant à la relation température-temps de  $n$ -ième réduction décimale, ( $TRT_n$ ), est choisie en fonction de critères technologiques et économiques.
- Les traitements thermiques correspondant aux points de cette  $TRT_n$ , appelée aussi TDT – relation température-temps de destruction des micro-organismes – doivent garantir la stérilité pratique du produit sans entraîner de modifications exagérées des propriétés (organoleptiques, physico-chimiques, thérapeutiques...).
  - Le choix de la TRT dépend :
    - de la contamination initiale avant traitement thermique et
    - de la contamination résiduelle tolérable.

### 3. Stérilisation par la chaleur

19

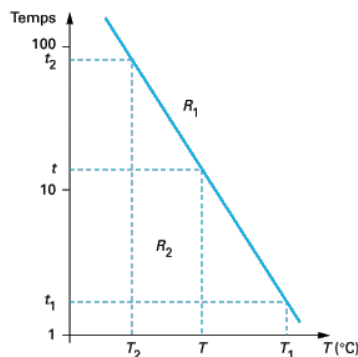
#### Exemple pratique

- Dans les cas de préparations contenant une bactérie extrêmement pathogène capable de synthétiser une toxine particulièrement dangereuse (par exemple une toxine responsable du botulisme).
- Cela justifie de prendre le maximum de précautions. La TRT<sub>12</sub> a été retenue dans ce cas.
- Le critère de sécurité admis est un traitement thermique capable de réduire une population de bactérie de  $10^{12}$  à  $10^0$  par gramme de produit.
- La contamination résiduelle peut paraître élevée et incompatible avec une sécurité suffisante pour les utilisateurs de la préparation, mais il faut considérer que **la contamination initiale n'est jamais égale à  $10^{12}$  spores** par gramme de produit mais plutôt de l'ordre de  $10^2$ .
- La contamination résiduelle est alors de  $10^{-10}$  spores/g, ce qui équivaut à la présence possible d'une spore dans 10 000 tonnes de produit.

### 3. Stérilisation par la chaleur

20

- Quatre grandes catégories de traitements thermiques peuvent être caractérisées :
  - traitements effectués à température relativement faible appliquée pendant une durée longue ;
  - traitements à température intermédiaire de durée intermédiaire ;
  - traitements à température élevée de durée courte (traitement HTST, *hot temperature short time*) ; (Exemple: HTST à  $71,7\text{ °C}$  pendant 15 à 20 s).
  - traitements à très haute température et pendant un temps très court (traitements UHT). (Exemple :  $150\text{ °C}$  pendant 2 à 5 s).



### 3. Stérilisation par la chaleur

21

#### ■ Stérilisation par la chaleur sèche\*

- Etuves ou four à air chaud à pression atmosphérique (procédé discontinu)
  - Tunnel de stérilisation (procédé continu)
  - Système de ventilation pour homogénéiser T
  - En milieu sec, les germes sont plus résistants
  
  - Pour avoir une destruction des germes, il faut au minimum:
    - 160°C pendant 2 h (Pharmacopée Européenne)
    - 180 °C pendant 30 minutes
    - 170°C pendant 1 h
    - 140°C pendant 4 h
  
  - Méthode réservée aux objets métalliques, stérilisation des récipients en verre pour préparations injectables ou matériel chirurgical.
- L'opération de stérilisation par la chaleur peut être associée à un traitement plus poussé: la dépyrogénéisation
  - L'objectif est de dégrader les substances pyrogènes présentes ou libérées lors de la stérilisation
  - Elle est pratiquée au delà de 220 °C

*\*Parfois cette méthode porte le nom de non inventeur, le Dr Poupinel*

### 3. Stérilisation par la chaleur

22

#### ■ Stérilisation par la chaleur sèche

- Possibilité d'avoir 2 compartiments
  - Un pour introduire les produits à stériliser
  - Un pour les récupérer dans une enceinte (ou salle) stérile

- L'air introduit dans les enceintes de stérilisation doit être filtré sur filtre HEPA *High Efficiency Particulate Air*
- Maintenir une surpression pour éviter l'entrée d'air non-stérile



*Image d'un four à chaleur sèche*

### 3. Stérilisation par la chaleur

23

#### ■ Stérilisation par la chaleur humide sous pression

- Stérilisation due à la vapeur d'eau qui se condense sur le matériel à stériliser de température inférieure à celle de la vapeur au cours de la phase de chauffage
- La chaleur libérée lors de la condensation de la vapeur accélère l'élévation de température
- Méthode recommandée car
  - La température est moins élevée
  - Elle garantit une stérilisation plus sûre
- Destruction des germes sous pression élevée  $P = 2P_{atm}$  durant 15 min et à  $T = 121\text{ °C}$  au minimum
- Le procédé de stérilisation le plus répandu
  - Facile à mettre en œuvre
  - Ecologique
  - Le plus économique

$$P_{atm} = 1\text{ atm} = 760\text{ mmHg} = 10^5\text{ Pa}$$

### 3. Stérilisation par la chaleur

24

#### ■ Stérilisation par la chaleur humide sous pression

- Charges à protection perméable la vapeur d'eau apporte la chaleur et l'eau.
- Charges à protection imperméable (exemple : solutés en flacons bouchés) : la vapeur d'eau apporte uniquement les calories, le contenu du flacon apporte l'eau.
- Dénaturation protéique par hydrolyse partielle des chaînes peptidiques

#### Appareils : l'autoclave

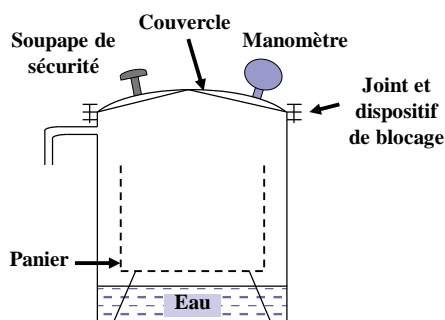


Schéma d'un autoclave classique



Photos d'autoclaves industriels

### 3. Stérilisation par la chaleur

25

#### ■ Stérilisation par la chaleur humide sous pression

Appareils: l'autoclave

- **Phases du cycle de stérilisation en autoclave**
- Purge d'air, chauffage de la charge stérilisation, refroidissement et séchage.
- La purge d'air
  - air = mauvais conducteur de la chaleur
  - retarde l'homogénéisation des températures
  - si purge insuffisante : persistance de poches d'air → stérilisation inefficace.
- Après la stérilisation
  - Dans le cas d'ampoules pleines: phase de détection des défauts et micro-fuites: « crack test »
  - Une dépression est maintenue dans l'enceinte afin de provoquer la casse des récipients non intègres dont la pression interne est encore supérieure

**Dans le cas de récipients fermés à parois souple: présence d'un système de contre-pression d'air comprimé pour éviter l'éclatement des récipients lors du refroidissement accéléré**

### 3. Stérilisation par la chaleur

26

#### ■ Stérilisation par la chaleur humide sous pression

Appareils: l'autoclave

- **Inconvénients de l'autoclave:**
  - **Fonctionnement en discontinu**
  - **L'appareil doit être hermétiquement clos pendant la stérilisation**

### 3. Stérilisation par la chaleur

27

#### ■ Stérilisation par la chaleur humide sous pression

*Appareils: Stérilisateur à la vapeur sous pression en continu*

- Adapté pour la stérilisation de produits préparés en grande quantité:
  - Flacons de solutions pour injection ou perfusion
- Deux colonnes d'eau (10m de haut) maintiennent sous pression la partie inférieure de l'appareil où arrive la vapeur
- La température est de 121°C et la pression est de 2 bars
- Les flacons à stériliser arrivent en continu et se réchauffent progressivement dans la première colonne
- Ils passent à travers la colonne de stérilisation où ils séjournent 20 à 30 minutes
- Les flacons ressortent de la chambre de stérilisation vers la chambre de refroidissement

### 3. Stérilisation par la chaleur

28

#### ■ La tyndallisation

- Il s'agit d'un procédé quasiment abandonné aujourd'hui
- La tyndallisation consiste à soumettre la charge à traiter à 3 cycles de traitements thermiques à basse température (70°C) séparés par 2 phases de 24 heures afin que les formes résistantes (spores) passent sous formes végétatives thermosensibles
- Utilisé autrefois pour les substances thermolabiles (au-delà de 70°C), il est remplacé aujourd'hui par la filtration stérilisante

### 3. Stérilisation par la chaleur

29

#### ■ Facteurs intervenant dans la stérilisation par la chaleur

- Facteurs liés aux microorganismes
- Facteurs liés au milieu
  - La destruction est plus rapide en milieu liquide qu'en milieu solide
  - pH: destruction plus aisée en milieu acide ou alcalin
- Facteurs liés au nombre
- Facteurs liés à la température
- Facteurs liés au temps



### 4. Stérilisation par les agents chimiques

## 4. Stérilisation par les agents chimiques

31

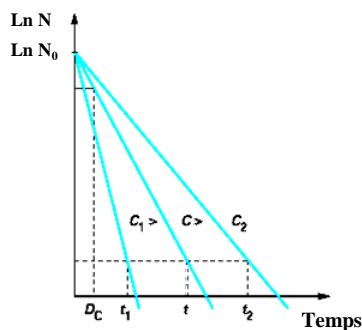
- L'activité bactéricide des agents gaz stériliants repose sur la **réaction d'alkylation des acides nucléiques des cellules et de certaines protéines**
- Souvent corrosifs, toxiques vis-à-vis du personnel (cancérigènes)

- La destruction chimique des micro-organismes est surtout utilisée pour l'assainissement des surfaces des matériels et des locaux dans les industries pharmaceutiques, alimentaires et biologiques

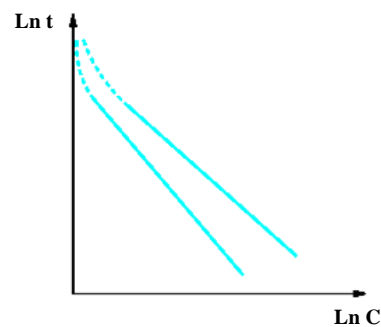
## 4. Stérilisation par les agents chimiques

32

- La cinétique de destruction des micro-organismes.
- La température étant maintenue constante, la destruction de la même population microbienne est d'autant plus rapide que la **concentration** en agent chimique est plus élevée. Il en résulte une variation du temps de réduction décimale  $D_C$ .



Courbe de survie à différentes concentrations en agent chimique



Relation concentration – temps de réduction décimale



## 4. Stérilisation par les agents chimiques

33

### ■ Paramètres susceptibles d'influencer la valeur de $D_c$

- $C \nearrow D_c \searrow$
- $T \nearrow D_c \searrow$
- pH, il existe un pH ou un intervalle de pH optimal d'action de l'agent stérilisant
- Qualité chimique de l'eau, en particulier sa dureté, présence de matière organique.

### ■ Le coefficient $F=C \cdot D_c$ permet de :

- Comparer l'efficacité de deux produits sur le même  $\mu$ -organisme,
- Tester les différences de sensibilité d'un même  $\mu$ -organisme à plusieurs produits chimiques.

Différents gaz sont actuellement utilisés mais leur emploi reste limité à cause de leur toxicité

- L'oxyde d'éthylène
- Le formol

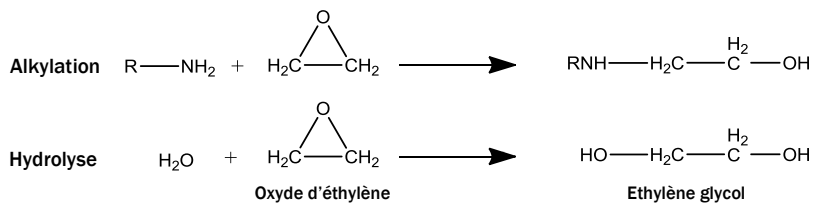
## 4. Stérilisation par les agents chimiques

34

### ■ L'oxyde d'éthylène (oxyrane)

- Utilisé pour le matériel:
  - Médico-chirurgical qui ne supporte pas la stérilisation à l'autoclave: PVC, polyéthylène, certains caoutchoucs...
  - D'autres matériaux tels que les cartons et les compresses de gaze
- Il présente l'avantage d'être utilisé sur des articles dans leur emballage définitif perméable à l'oxyde d'éthylène

#### Réactivité



## 4. Stérilisation par les agents chimiques

35

### ■ L'oxyde d'éthylène (oxyrane)

#### • Propriétés:

- $T_{\text{ébullition}}$  : 10,7 °C, densité : 1,52
- Miscible à l'eau
- $D_T$  : 2,7min, T : 50 °C
- Valeur d'inactivation thermique  $Z=40$  °C
  
- Polymérise facilement à l'état liquide
- Inflammable
- Toxique pour l'homme: irritations, brûlures sévères, mutagène, cancérigène
  
- Son utilisation doit être restreinte au maximum:
  - Ceci n'est pas toujours possible car la radiostérilisation rend les matériaux en PVC cassants (exemple: perfuseurs)

Z: Elévation de température nécessaire pour réduire la valeur de  $D_T$  d'un facteur 10

## 4. Stérilisation par les agents chimiques

36

### ■ Le formol

- Formaldéhyde,
- Aldéhyde formique
- Méthanal
- $\text{CH}_2\text{O}$

- Il nécessite une atmosphère humide
- Demande un temps de contact de plusieurs heures pour être efficace
- Il doit ensuite être éliminé par ventilation avec de l'air stérile car il est irritant et toxique
- Gaz peu pénétrant
  - Il convient pour la stérilisation du matériel et des locaux



## 5. Stérilisation par des rayonnements



## 5. Stérilisation par des rayonnements

38

### ■ Rayonnements UV

- Pouvoir microbicide des UV très élevé pour les courtes  $\lambda$  (0,2 $\mu$ m)
- Cependant, ces rayonnements sont arrêtés facilement par le moindre obstacle et notamment le verre
  - Ne peut être appliqué aux préparations en ampoules ou flacons
  - Utilisés pour la stérilisation de l'atmosphère des enceintes stériles
- Peuvent provoquer des accidents oculaires très graves
- Ils sont de moins en moins utilisés

### ■ Irradiations utilisant les électrons accélérés

- Peut traverser des parois allant de 0,6 mm à 30 cm de l'énergie de l'accélérateur

### ■ Irradiations à rayonnement X

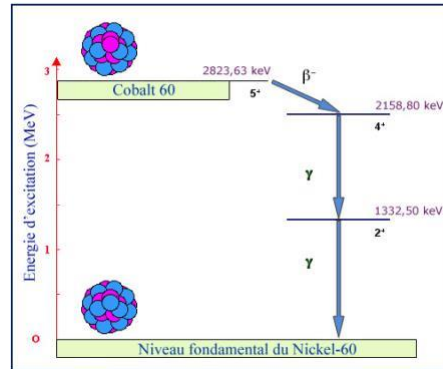
- RX produit par l'action d'un faisceau d'e<sup>-</sup> accélérés sur une cible métallique

## 5. Stérilisation par des rayonnements

39

### ■ Irradiations à rayonnement $\gamma$

- Sources à  $^{60}\text{Co}$
- Le rayonnement  $\gamma$  pénètre la matière, ionise les atomes et forme des radicaux libres responsables de l'activité germicide
- Il faut déterminer fréquemment l'activité de la source au cours du temps  $\Rightarrow$  calculer le temps d'exposition  $\Rightarrow$  garantir que la dose permet d'assurer une stérilité
- Les irradiateurs sont de grandes dimensions, protégés par d'épais murs en béton



- Stérilisation du matériel médico-chirurgical (seringues, aiguilles, matériel de perfusion, sondes, appareils pour dialyse sanguine)
- Stérilisation des articles de pansements et de suture

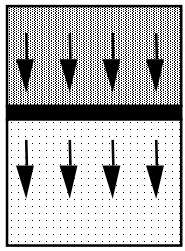
+

## 6. La filtration stérilisante

## 6. La filtration stérilisante

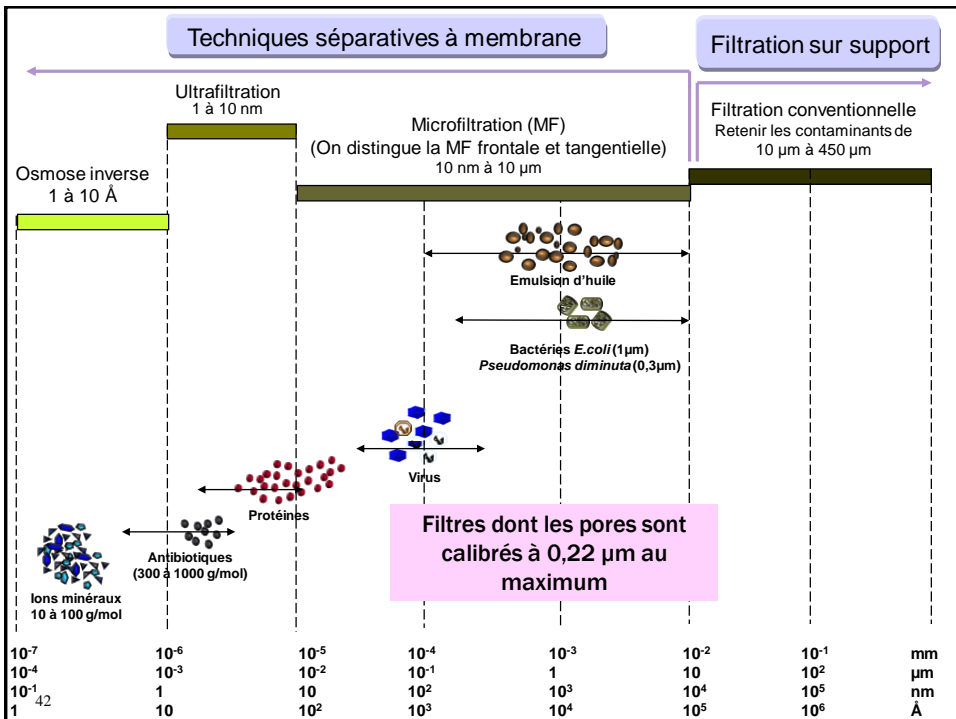
41

- **Définitions**
  - La filtration stérilisante est une opération qui a pour but de séparer les micro-organismes qui contaminent un fluide à l'aide d'un milieu filtrant poreux
  - Elle s'applique aux **gaz** et **liquides monophasiques**



Fluide à filtrer  
Filtre  
Filtrat ou effluent

○ Le solution après traversée du filtre doit être recueillie et répartie aseptiquement



## 6. La filtration stérilisante

43

- **La filtration stérilisante: précautions à prendre**
  - Tout le matériel de filtration et du circuit de répartition doit être stérilisé:
    - Flacons et récipients, tuyauterie
  - Partir d'une solution aussi pauvre en germes que possible. Il faut fixer un maximum acceptable de contamination ou « biocharge » avant la filtration stérilisante
  - Il est recommandé d'ajouter par mesure de sécurité supplémentaire un bactériostatique et de faire une préfiltration
  - De s'assurer que les propriétés stérilisantes du filtre sont maintenues durant son utilisation
  - Les filtres réutilisables doivent être contrôlés régulièrement car leur porosité peut évoluer
  - Il y a intérêt à installer un pré-filtre pour éviter le colmatage précoce du filtre stérilisant
  - Conditionnement dans des locaux stériles par un personnel équipé de combinaisons stériles spéciales et de lunettes pour protéger contre les UV

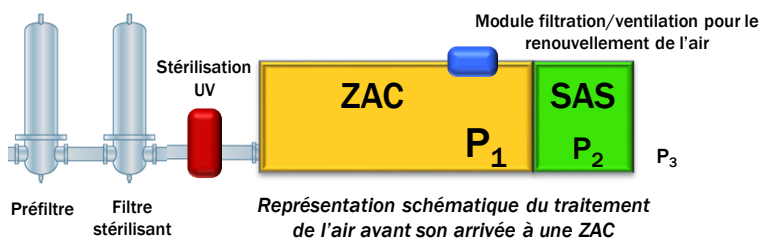
## 6. La filtration stérilisante

44

- **La filtration stérilisante: précautions à prendre**
- **Conditionnement aseptique des produits après filtration stérilisante**
  - Zones à atmosphère contrôlée (ZAC)
  - Filtration stérilisante de l'air introduit dans les ZAC
    - Installation de **filtres stérilisants** précédés de **préfiltres** (dépoussiérage, germes)
    - Par mesure de sécurité, des **tubes à UV** germicides peuvent être installés dans les gaines d'entrée d'air après les filtres stérilisants

Air circule toujours de la pression la plus élevée à la pression la plus faible

Pour éviter que l'air pénètre dans une ZAC, elles sont maintenues en surpression



## 6. La filtration stérilisante

45

- **La filtration stérilisante: précautions à prendre**
- **Conditionnement aseptique des produits après filtration stérilisante**
  - Zones à atmosphère contrôlée (ZAC)
  - Le gros matériel présent dans une ZAC est stérilisé par des agents chimiques (formol, oxyde d'éthylène ou acide peracétique)
  - Les récipients destinés à être introduits dans une ZAC sont stérilisés par la chaleur
    - Chaleur sèche
      - Il faut au minimum: 160 °C pendant 2 h (Pharmacopée Européenne)
    - Chaleur humide (autoclave)
      - Destruction des germes sous pression élevée  $P= 2P_{atm}$  durant 15 min et à  $T=121$  °C au minimum