

Czystość i sterylność

Dr Gerald McDonnell z firmy STERIS analizuje zastosowanie dekontaminacji i sterylizacji przy użyciu gazowego nadtlenu wodoru (VHP®) w laboratoriach farmaceutycznych i przy produkcji wyrobów medycznych.

Procesy dekontaminacji i sterylizacji mogą być prowadzone z wykorzystaniem różnorodnych metod [7]. Okresowa dekontaminacja środowisk krytycznych może się na przykład odbywać przy użyciu tradycyjnej techniki wycierania powszechnie dostępnymi środkami biobójczymi. Do tego celu wykorzystuje się szeroką paletę preparatów różniących się od siebie skutecznością biobójczą i kompatybilnością materiałową. Do najpowszechniej stosowanych środków zalicza się czwartorzędowe związki amoniowe oraz substancje utleniające.

Ogólnie rzecz biorąc, metody tego rodzaju są wyjątkowo czasochłonne i wymagają dużego nakładu pracy. W przypadku mniejszych powierzchni możliwa jest ich walidacja, dużo trudniej jednak zapewnić skuteczność procesu w odniesieniu do większych przestrzeni. Alternatywą są techniki fumigacyjne tradycyjnie wykorzystujące formaldehyd – związek odpowiedni dla dużych kubatur, ale trudny do nadzorowania, działający powoli i, co ważniejsze, niebezpieczny dla zdrowia [10].

Do powszechnego użycia wchodzi obecnie alternatywne metody zautomatyzowanej dekontaminacji. O ich popularności decyduje przede wszystkim łatwość stosowania, wyższy poziom zapewnienia sterylności i niższe koszty eksploatacji. Metody alternatywne to obecnie systemy działające w oparciu o nadtlenek wodoru, ozon i dwutlenek chloru. Do najpowszechniej używanych i uznawanych należą systemy wykorzystujące gazowy nadtlenek wodoru (VHP) stosowany do dekontaminacji różnego rodzaju przestrzeni zamkniętych, w tym pomieszczeń czy innych izolowanych zamkniętych kubatur [2]. Technologia wykorzystująca fazę gazową nadtlenu wodoru opracowana została w latach osiemdziesiątych przez firmę STERIS (dawniej AMSCO). W roku 1985 metoda uzyskała rejestrację amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska EPA.

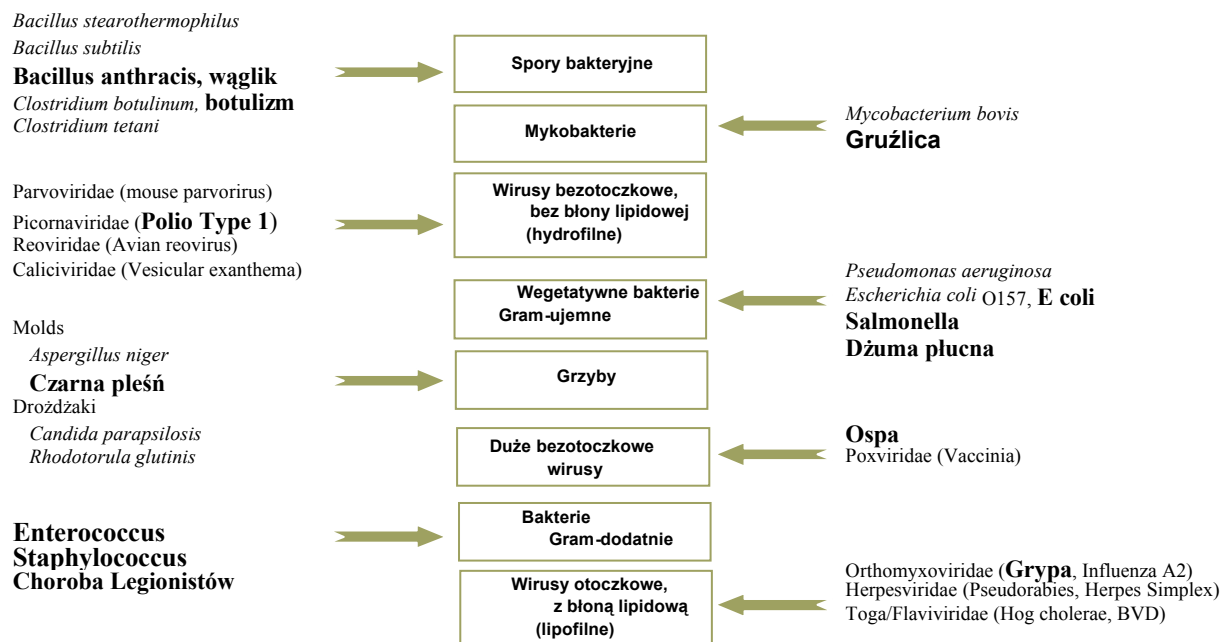
Procesy dekontaminacji i sterylizacji można podzielić na próżniowe i przebiegające pod ciśnieniem atmosferycznym. Układy VHP działające pod ciśnieniem atmosferycznym zapewniają szybkość, niskotemperaturową dekontaminację przestrzeni zamkniętych, które mogą zawierać różnorodne mikroorganizmy, w tym bakterie przetrwalnikowe. Systemy tego rodzaju wykorzystywane są powszechnie do zwalczania patogenów zawieszonych w powietrzu oraz znajdujących się na powierzchniach w izolatorach, komorach laminarnych, pomieszczeniach, przewodach i filtrach w placówkach produkcji farmaceutycznej, zwierzętarniach oraz laboratoriach badawczych o wysokiej klasie bezpieczeństwa biologicznego. Próżniowe systemy VHP gwarantują większą penetrację gazu w przypadku opakowanego sprzętu medycznego, wirówek i suszarek mrozących. Ostatnio technologia ta została zastosowana do sterylizacji niskotemperaturowej opakowanych wyrobów medycznych.

Gazowy nadtlenek wodoru VHP (Vaporised Hydrogen Peroxide)

VHP powstaje na drodze waporyzacji ciekłego nadtlenu wodoru (w temperaturze 120°C), w wyniku czego uzyskujemy mieszaninę VHP i pary wodnej. Ponieważ mamy do czynienia z procesem „suchym” stężenie VHP utrzymywane jest poniżej punktu kondensacji. Wartość tego punktu jest zależna od temperatury otoczenia. W przypadku dekontaminacji pomieszczeń stężenie VHP utrzymywane jest zazwyczaj znacznie poniżej poziomu nasycenia, na poziomie 0,1-1,5mg/l w temperaturze 25°C. W przypadku sterylizacji wyrobów medycznych możliwe jest zastosowanie wyższych stężeń przy zachowaniu wyższej temperatury procesu (na ogół do 60°C). Jeśli stężenie VHP przekroczy punkt nasycenia w danej temperaturze, dochodzi do kondensacji stężonego nadtlenu wodoru na powierzchniach, ponieważ substancję tę charakteryzuje niższa wartość ciśnienia parowania niż ciśnienie parowania wody. W takiej sytuacji, pomimo właściwości biobójczych powstałego kondensatu, proces staje się nieprzewidywalny i potencjalnie niebezpieczny dla powierzchni. Aby uniknąć ryzyka wystąpienia takich powikłań w czasie procesu VHP, istotne jest odpowiednie opracowanie cyklu dla danego pomieszczenia z uwzględnieniem temperatury i objętości dekontaminowanej przestrzeni. Istnieją także systemy wykorzystujące powstały kondensat nadtlenu wodoru do dekontaminacji powierzchni. Przeprowadzany jest wówczas tzw. proces „mokry”, różniący się od metody VHP pod względem właściwości biobójczych i kompatybilności materiałowej. Tego rodzaju procesy nie stanowią jednak przedmiotu zainteresowania niniejszego artykułu i nie będą opisane poniżej.

Metodę VHP cechuje bardzo szerokie spektrum aktywności wirusobójczej, bakterioobójczej, grzybobójczej i sporobójczej [4-6] (rys. 1). Najnowsze badania dowodzą skuteczności metody VHP w zwalczaniu parwowirusów [8], jaj nicieni [1], Legionelli oraz patogenów zawartych w żywności [9]. Choć nieznanym jest dokładny mechanizm działania biobójczego nadtlenu wodoru, najprawdopodobniej rodniki hydroksylowe wchodzi w reakcję z najistotniejszymi elementami składowymi komórki prowadząc do jej śmierci [7].

Uznane za trudniejsze do wyeliminowania



Uznane za łatwiejsze do wyeliminowania

Podobnie jak w przypadku innych metod biobójczych, tak i w przypadku VHP najwyższą odporność na działanie metody wykazują spory bakteryjne (szczególnie spory *Bacillus stearothermophilus*), niezależnie od obecności lub braku na powierzchniach materii organicznej (5% - surowica krwi, 50% - krew pełna) [4, 5, 11]. W przeciwieństwie do ciekłej formy nadtlenu wodoru, postać gazowa jest gwałtownie sporobójcza już w niskich stężeniach (nawet 0,1 mg/l). Porównanie aktywności sporobójczej VHP i ciekłego nadtlenu wodoru znajduje się w Tabeli 1.

Tab. 1 AKTYWNOŚĆ SPOROBÓJCZA H₂O₂ W FAZIE CIEKŁEJ I GAZOWEJ

TESTOWANY MIKROORGANIZM (spory)	D-VALUE (czas potrzebny do zabicia 1 LOG testowanego mikroorganizmu/minutę)	
	FAZA CIEKŁA stężenie H ₂ O ₂ 370mg/L Temperatura 24-25°C	FAZA GAZOWA stężenie H ₂ O ₂ 1-2mg/L Temperatura 24-25°C
<i>B. stearothermophilus</i>	1,5	1-2
<i>B. subtilis</i>	2-7,3	0,5-1
<i>C. sporogenes</i>	0,8	0,5-1

Biodekontaminacja VHP to proces „suchy”, wykorzystujący znacznie niższe stężenia substancji czynnej niż w przypadku metod bazujących na cieczach utleniających (wybielacz chlorowy czy kombinacje nadtlenu wodoru i kwasu nadoctowego). Decyduje to o wyjątkowej kompatybilności materiałowej metody VHP, która jest bezpieczna dla większości materiałów, w tym metali (np. stal nierdzewna serii 300, aluminium, tytan), plastików (np. polipropylen, polietylen, PCV i poliwęglany) i innych materiałów t.j. silikon, szkło, dzieła sztuki oraz sprzęt elektroniczny. System biodekontaminacyjny VHP 1000 już od ponad 10 lat używany jest w produkcji

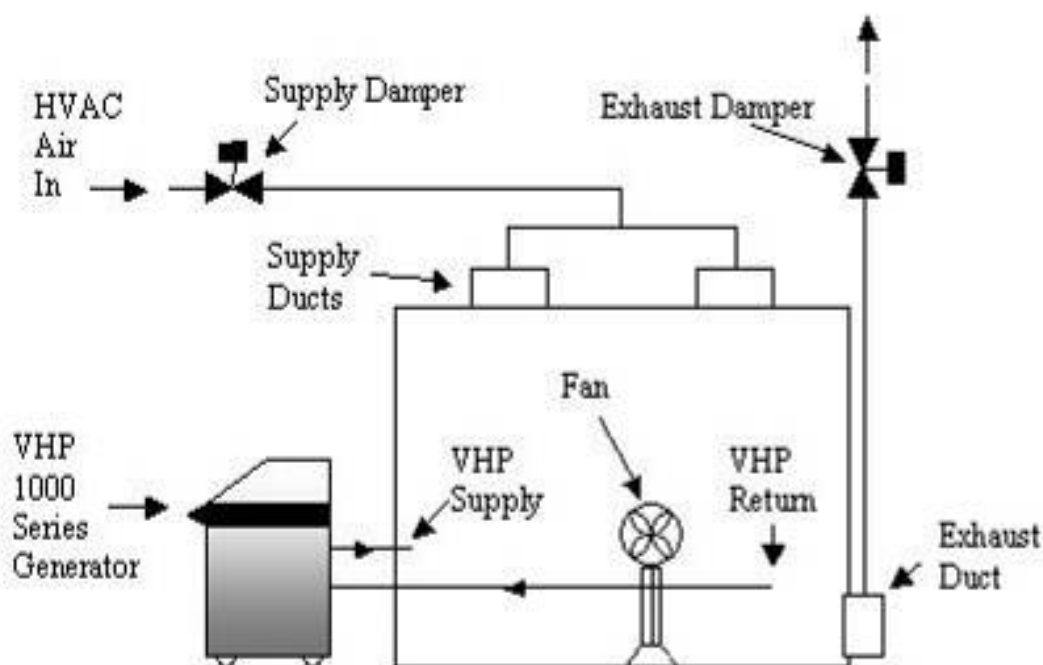
farmaceutycznej i innych zastosowaniach przemysłowych, zyskując sobie opinię bezpiecznej metody dekontaminacji izolatorów i innych przestrzeni izolowanych [6].

Ze względu na adsorbencję i rozpad nadtlenku wodoru najtrudniejszym wyzwaniem dla tej metody jest dekontaminacja materiałów opartych na celulozie. Trudności wiążą się także z metalami takimi jak miedź i mosiądz, które prowadzą do rozpadu nadtlenku wodoru, w wyniku czego, w przypadku przedłużonego kontaktu z powierzchnią może dochodzić do przebarwień. Nie wpływa to jednak na zmianę właściwości fizycznych metali.

Dużą zaletą metody jest jej doskonały profil bezpieczeństwa i przyjazność środowisku. W przeciwieństwie do ciekłego nadtlenku, VHP bardzo szybko rozpada się na tlen i parę wodną, nie stanowi więc zagrożenia dla środowiska naturalnego. Należy jednakże unikać bezpośredniego kontaktu z VHP o stężeniu biobójczym ($>0,1\text{mg/l}$). Powszechnie uznaje się, że bezpieczne dla personelu stężenie VHP pozwalające na przedłużony kontakt ze środkiem to 1ppm na 8 godz. (średnia ważona w czasie); poziom krótkotrwałego zagrożenia to 75 ppm przez 30 minut. VHP jest gazem bezwonny i bezbarwny, jednak stężenie powyżej 1 ppm ma działanie wyraźnie drażniące. Dostępne są proste urządzenia monitorujące poziom nadtlenku w obrębie danej przestrzeni.

Zastosowania pod ciśnieniem atmosferycznym

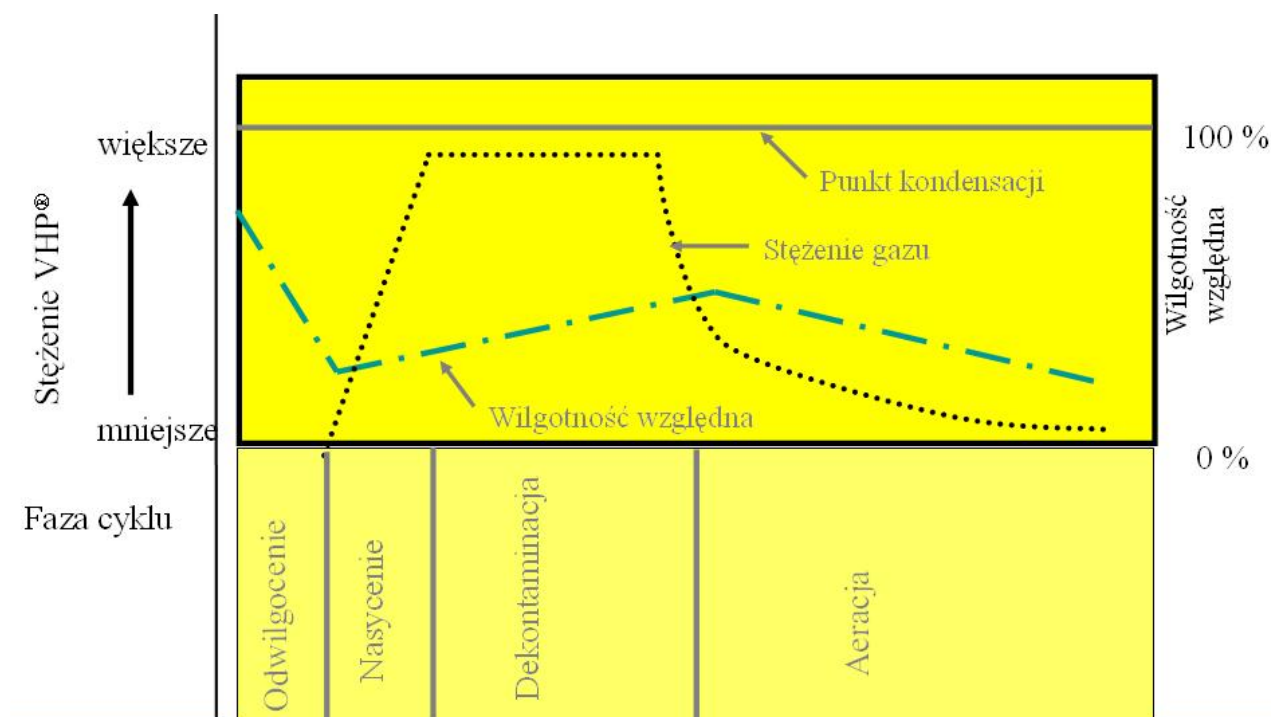
Seria biodekontaminacyjna VHP 1000, pracująca pod ciśnieniem atmosferycznym, od 10 lat jest powszechnie wykorzystywana w przemyśle do dekontaminacji środowisk gdzie wykonywane są testy na jałowość, w produkcji - do dekontaminacji linii napełniania, komór laminarnych, pomieszczeń i innych zamkniętych przestrzeni. Pojedyncza mobilna jednostka (VHP1000 lub VHP 1000ED o zwiększonej wydajności) wytwarza, wprowadza, kontroluje i odprowadza VHP z pomieszczenia zamkniętego o kubaturze do 23m^3 , przy czym w przypadku większych objętości możliwe jest równoczesne zastosowanie większej ilości jednostek. Typowa konfiguracja urządzenia w przypadku dekontaminacji pomieszczenia pokazana została na rys. 2.



Dostępne są także systemy modułowe (VHP M1000) umożliwiające bezpośrednią integrację z pomieszczeniem. W ostatnim czasie opracowano również systemy przeznaczone do dekontaminacji mniejszych powierzchni (VHP100 i M100) oraz większych kubatur. Te ostatnie znajdują swe zastosowanie w przypadku

objętości większych niż 5800m³. Przebieg typowego cyklu biodekontaminacji pod ciśnieniem atmosferycznym zilustrowano na rys. 3.

Typowy cykl VHP w warunkach ciśnienia atmosferycznego



Cykl składa się z trzech faz:

- 1) odwilgocenia
- 2) nasycenia
- 3) sterylizacji
- 4) aeracji.

Przebieg poszczególnych faz jest sterowany i monitorowany przez samą jednostkę. Przeznaczone do dekontaminacji pomieszczenie poddawane jest na ogół odwilgoceniu, aż do osiągnięcia poziomu poniżej 40% wilgotności względnej. Następnie rozpoczyna się wprowadzanie VHP do momentu osiągnięcia stężenia biobójczego (nasycenie). W czasie fazy sterylizacji system utrzymuje nadtlenek wodoru w formie suchego gazu, dzięki czemu maksymalizowana jest skuteczność w danym otoczeniu. Podczas fazy sterylizacji system na bieżąco odprowadza i uzupełnia nadtlenek wodoru w pomieszczeniu. Cykl VHP to proces „suchy”, ponieważ stężenie nadtlenku przez cały czas utrzymywane jest poniżej krytycznego punktu kondensacji.

W czasie fazy aeracji wprowadzanie VHP do pomieszczenia zostaje wstrzymane, a gaz jest odprowadzany przez generator aż do osiągnięcia bezpiecznego poziomu stężenia (<1 ppm). Czas cyklu różni się w zależności od kubatury, wymaganego poziomu dekontaminacji i zawartości pomieszczenia. Dla przykładu, czas cyklu w przypadku laboratorium badawczego (>162m³) gdzie stwierdzono obecność parwowirusów wyniósł mniej niż 3 godziny [8]; dekontaminacja pomieszczenia czystego o kubaturze 65m³ - 2,5 godziny [6]. Zautomatyzowany cykl dekontaminacyjny pozwala na rutynową walidację i zapisywanie parametrów cyklu.

Zastosowania próżniowe

Zastosowania w warunkach próżniowych zostały stworzone z myślą o zwiększonej penetracji gazu. Na przykład system VHP1000DV to mobilna jednostka do sterylizacji suszarek mrozących i linii napełniania aseptycznego [3,4]. Najnowszym osiągnięciem jest seria VHP MD, działająca w oparciu o podobną technologię próżniową i pozwalająca na sterylizację prostych i złożonych wyrobów medycznych. Jednostki tej serii dostępne są w różnych rozmiarach komory, wyposażone w panel dotykowy i duży wybór wyposażenia dodatkowego.

Na typowy cykl sterylizacji próżniowej VHP składają się: test szczelności (opcja), nasycenie, sterylizacja i aeracja (rys. 4).

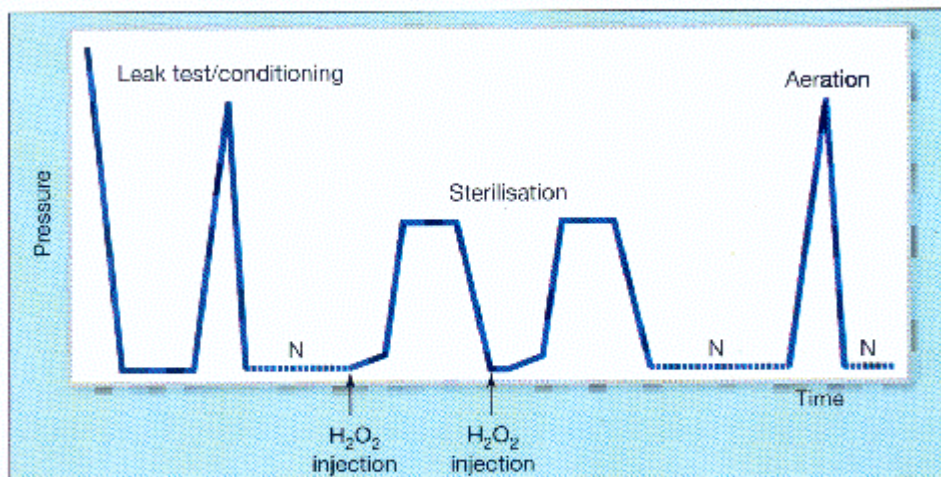


Fig. 4 Typical VHP MD cycle for device sterilisation

Istnieje możliwość przeprowadzenia dodatkowego testu szczelności polegającego na utrzymywaniu w komorze próżni przez określony wcześniej czas i równoczesnym monitorowaniu komory pod kątem wystąpienia nieszczelności. W fazie nasycania (lub suszenia) układ próżniowy wykorzystywany jest do osuszania komory/wsadu i osiągnięcia temperatury sterylizacji (na ogół w zakresie 25-50°C). Na cykl sterylizacyjny składa się osiągnięcie głębokiej próżni, wprowadzenie i dyfuzja VHP, a następnie wykorzystanie suchego powietrza lub azotu do osiągnięcia wyznaczonej wartości ciśnienia (0,5-700 Torr, 0,67-933 mbar). VHP uzyskiwane jest na drodze waporyzacji z 35% roztworu nadtlenu wodoru. Analogicznie do zastosowań pod ciśnieniem atmosferycznym, stężenie nadtlenu wodoru utrzymywane jest poniżej punktu nasycenia, aby nie dopuścić do kondensacji na powierzchni urządzenia oraz zoptymalizować aktywność biobójczą i kompatybilność materiałową VHP.

W przypadku sterylizacji wyrobów medycznych dokładna ilość wymaganych impulsów sterylizacyjnych może być różna w zależności od rodzaju sterylizowanego sprzętu, rozmiarów wsadu oraz materiałów opakowaniowych i rodzaju samego opakowania. W czasie ostatniej fazy, aeracji, układ próżniowy wykorzystywany jest do gwałtownego usunięcia VHP z komory poprzez serię impulsów próżnia/powietrze. Dodatkowy czas aeracji nie jest potrzebny, w przeciwieństwie do podobnych zastosowań wykorzystujących tlenek etylenu. Pozwala to skrócić czas trwania procesu oraz zminimalizować koszty produkcji. Chociaż czas cyklu różni się w zależności od zastosowania, łączna długość procesu wynosi na ogół poniżej trzech godzin.

W porównaniu z karcegennym tlenkiem etylenu, VHP sprawia znacznie mniej trudności z punktu widzenia toksyczności. Nadtlenek wodoru używany jest bezpośrednio na skórę przy stężeniu 30.000-60.000mg/l (3-6%), przy stężeniu 7.500mg/l na błonę śluzową jelita, a w stężeniu 500-1.500mg/l na tkankę oka. W przeciwieństwie do tlenku etylenu, VHP nie pozostawia toksycznych produktów, ponieważ produktami rozpadu nadtlenu wodoru są tlen i woda.

Wnioski

Metoda VHP to bezpieczna, skuteczna i wydajna alternatywa dla dotychczas stosowanych technik dekontaminacji powierzchni oraz sterylizacji produktów. Gazowy nadtlenek wodoru to sucha, szybko działająca substancja biobójcza o dużym spektrum aktywności i szerokiej kompatybilności materiałowej. Proces VHP pozwala także skrócić czas cyklu zachowując wymogi bezpieczeństwa użytkownika i środowiska naturalnego. Zastosowania pod ciśnieniem atmosferycznym są powszechnie stosowane do dekontaminacji pomieszczeń, a nowsza metoda próżniowa umożliwia głębszą penetrację gazu i sterylizację wyrobów medycznych.

Bibliografia:

1. Austin, E.J., G.E. McDonnell, G.Mullen, B.E. Gordon. 2002. The efficacy of vapour phase hydrogen peroxide against nematode infestation: the *Caenorhabditis elegans* model. American Association of Laboratory Animal Science (AALAS), Annual meeting, San Antonio, TX. 27-31 październik 2002.
2. Jahnke, M., G. Lauth. 1997. Biodecontaminat ion of a large volume filling room with hydrogen peroxide. *Pharm. Eng.* 17, 96-108.

3. Johnson, J.W., J.B. Arnold, S.L. Nail, E. Renzi. 1992. Vapourized hydrogen peroxide sterilization of freeze dryers. *J. Parent. Sci. Techn.* 46: 215-225.
4. Klapes, N.A., Vesley, D. 1990. Vapour-phase hydrogen peroxide as decontaminant and setrilant. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 503-506.
5. Kokubo, M., Inoue, T., Akers, J. 1998. Resistance of common environmental spores of the genus *Bacillus* to vapour hydrogen peroxide vapour. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 52: 228-231
6. Malmbor, A., Wingren, M., Bonfield, P., McDonnell, G. 2001. Room decontamination with vaporized hydrogen peroxide. *Cleanrooms. Listopad*, 2001.
7. McDonnell, G., Russel, A.D. 1999. Antiseptics and disinfectants. Activity, action and resistance. *Clin. Micro. Rev.* 12: 147-179.
8. McDonnell, G., Belere, B., Fritz, C., Hartling, J. 2001. Room decontamination with vapour hydrogen peroxide. VHP for environmental control of parvovirus. American Association of Laboratory Animal Science (AALAS), Annual meeting, Baltimore, MD. 21-25 październik 2001.
9. McDonnell, G., Grignol, G., Antloga, K., 2002. Vapour phase hydrogen peroxide decontamination of food contact surfaces. *Diary Food Environ. Sanit.* 22: 23-28.
10. Peters, J., Spicher, G., 1981. Room disinfection by formaldehyde vaporisation. *Hyg. Med.* 6: 337-344.
11. Rickloff, J., Osielski, P. 1989. Resistance of various microorganisms to vapourised hydrogen peroxide in a prototype table top sterilizer, abstr. Q-59, p. 339. W Abstracts of the 89th Annual Meeting of the American Society for Microbiology 1989. American Society for Microbiology, Waszyngton.

Kontakt: Dr Gerald McDonnell, STERIS
Tel. +44(0)1256 866560

- Rys. 1 Skuteczność biobójcza VHP, kolejność zgodnie z malejącą odpornością
- Rys. 2 Typowa konfiguracja pomieszczenia w czasie dekontaminacji VHP1000
- Rys. 3 Typowy cykl biodekontaminacyjny VHP®1000
- Rys. 4 Typowy cykl sterylizacyjny VHP MD

Tabela 1. Aktywność biobójcza ciekłego i gazowego nadtlenu wodoru.