

STERILIZZAZIONE CON MICROONDE DI RIFIUTI SANITARI: DETERMINAZIONE DIRETTA DELL'EFFICACIA DEL PROCESSO

Placido Alfredo Lanza^{1*}, Carmelo Massimo Maida², Laura Benanti³,
Giuseppe Giliberto³, Salvatore Nicosia⁴

¹ Università degli Studi di Palermo, Dip.to DICAM, Palermo .

² Università degli Studi di Palermo, Dip.to di Scienze per la Promozione della Salute e Materno Infantile.

³ Ingegnere libero professionista.

⁴ Università degli Studi di Palermo, Dip.to DICAM, Palermo.

Sommario – Nella sterilizzazione di rifiuti sanitari a rischio infettivo (RSP-I) le microonde (MO) sono proposte come alternativa al vapore. L'efficacia è verificata determinando la frazione sopravvissuta al processo, di una certa popolazione di micro-organismi. Convenzionalmente, questa popolazione è introdotta nella massa dei rifiuti sotto forma di fiale chiuse; queste costituiscono un ambiente artificiale, sul quale l'agente sterilizzante potrebbe *a priori* avere un'efficacia diversa rispetto alla massa direttamente esposta. In particolare, un agente fisico penetrante come le MO potrebbe sterilizzare il contenuto di una fiala *standard* meglio di quanto faccia il vapore. Questo indurrebbe a ridurre l'energia somministrata sotto forma di MO rispetto a quella considerata soddisfacente se trasferita col vapore; col rischio che questa dose in realtà per i rifiuti circostanti la fiala non basti. La richiesta di validazione di apparecchi di sterilizzazione a MO ha promosso la sperimentazione di procedure di misura della carica batterica che non abbiano barriere: cioè che contino le stesse *cellule traccianti*, ma dopo la loro dispersione nell'intera massa all'inizio e il loro recupero alla fine. L'oggetto di questa sperimentazione è stato duplice: sterilizzare in laboratorio con MO dei campioni sintetici di RSP-I, prima contaminati con spore, simulando il percorso di un rifiuto fino alla sterilità finale perseguita; e provare una tecnica di conta diretta della carica batterica nella massa. Nelle diverse sessioni sono stati fatti variare il contenuto di umidità e l'energia somministrata con le MO; sono stati registrati gli andamenti della temperatura e sono state determinate le percentuali di inattivazione delle spore. Sono stati individuati alcuni aspetti critici della procedura, legati al materiale recupero delle spore, alla pezzatura del rifiuto e alle caratteristiche del forno; oltre al prevedibile inconveniente di dover maneggiare non delle fiale ma dei campioni di rifiuto, con dispendio di tempo-operatore.

Parole chiave: rifiuti infettivi, sterilizzazione, microonde, conta batterica, indicatori micro-biologici.

MICROWAVE STERILIZATION OF HEALTHCARE WASTE: DIRECT DETERMINATION OF PROCESS EFFICIENCY

Abstract – In the sterilization of those Health Care Waste that are marked as possibly infectious, microwaves (MW) have long been proposed as an alternative means to steam. The effectiveness of the operation is assessed determining the fraction that has survived to the sterilizing agent of a known starting population of micro-organisms. Customarily, this population is introduced into the waste mass in the form of one or more sealed vials. These make up an artificial environment which is completely under control; but onto it the sterilizing agent could *a priori* behave with higher or lower effectiveness, compared with the loose mass which is directly exposed to it. As far as the traditional steam sterilization has been the only process available, the meaning and representativeness of the micro-organisms' response in sealed vials have not been questioned. In principle, however, a penetrative physical sterilizing agent – as MWs are – could sterilize a standard vial's content better than would do steam, which will just flow around it. If an operator is about deciding whether to shift to MWs, this success induces him to reduce the energy to feed to the waste mass, compared to that he deemed satisfactory before, when transferred by steam. Since the onset of MW sterilization technique, therefore, a need for validation in the most realistic conditions arose. This demand drives researchers to work out techniques for bacterial count that have no barriers: that is, techniques that count the same *tracing* cells, but after they, 1) have been freely dispersed in the whole mass; 2) have undergone the same disinfecting actions as the surrounding mass; 3) have been sampled from the mass at the end of the process. It is evident that – in order to gain certainties in phase 2 – two severe uncertainties have been unwillingly introduced as phases 1 and 3. Indeed, the experimental campaign on which this paper reports was aimed at simulating at lab scale the MW sterilization of synthetic waste samples which had been contaminated with known amounts of spores; to get quantitative information on the efficiency and identify the possibly critical steps of the whole procedure. In the 6 different sessions that were run, the operational variables were the waste moisture content (25% – 80%) and the amount of energy supplied as MW; residence time 40 min instead was common to all tests. The temperature patterns were recorded, and at the end the whole mass was washed to detach the spores for following cultivation – count. In this way the critical features of the procedure were identified and ranked by severity. It was foreseen that the procedure would be

* Per contatti: Dip.to DICAM – Area Idraulica e Ambientale, Viale delle Scienze Ed. 8, 90128 Palermo. Tel. 091.23896529; Fax 091.23860810, e-mail: placidoalfredo.lanza@unipa.it

time-consuming and would require handling of considerable amounts of water and glassware. The experiments showed something more serious: actually, the physiological solution alone – without any surfactant agent added – is unable to detach quantitatively the spores from the waste chips and the beaker walls. Addition of a few drops of surfactants – as was done by Oliveira et al. (2010) – is thus a technical detail which is critical for the success of the whole treatment – analysis chain. Of course we ought to have the certainty that the surfactant chosen does not interfere with the growing medium and / or the bacterial viability in the plate cultivation following. The loss of viable spores in washing the waste batches was calculated by us: 1) sampling and cultivating 1 ml wash solution coming from the *control sample* inoculated and not irradiated (called K^+); and then, 2) comparing the result with the known *inoculum*. Regrettably, less than 2% spores were found have been recovered. Under the hypothesis that the washing operation is replicable and is not affected by the “irradiated / non irradiated” condition, the disinfection efficiency was then calculated on K^+ number. About the results: the MW reduction of microbial load in irradiated batches was just mediocre (98,2%), short of the prescribed 99,99%. The best result was attained with a sample with 60% moisture and unit power input 272 W, corresponding to a unit input of 350 W kg⁻¹ of sample waste. In principle, MW irradiation will heat up waste mass; and this in turn will contribute to microbial inactivation. Water content has a complex relationship with this phenomenon, since the driest batches interact too weakly, while moistest batches do interact but their moisture use up most of the heat. In this experimental campaign, moisture decreased by around 10-30%; but no reliable correlation is evident.

Keywords: *healthcare waste, sterilization, microwave, bacterial count, micro-biological indicators.*

Ricevuto il 8-3-2018; Correzioni richieste il 30-5-2018; Accettazione finale il 24-7-2018

1. INTRODUZIONE

Nei processi che avvengono in matrici complesse si presenta regolarmente il dilemma fra i due estremi a) di misurare una sola sostanza, che è ritenuta rappresentativa e facile da determinare, e b) di tentare di determinare le modificazioni dell'intera massa trattata.

Lo schema seguente rappresenta l'idea, i cui esempi sono noti a tutti. La combinazione A-1 p.es. si realizza nei “profili di salinità” nelle campagne di misura in mare, o nella misura continua del potenziale redox nel trattamento acque; la situazione B-2 descrive la strategia del controllo di un sistema fisico basato sul laboratorio, e così via.

$\left\{ \begin{array}{l} \text{A - Intera massa} \\ \text{B - Campione rappresentativo} \\ \text{C - Campione confinato} \\ \text{aggiunto appositamente} \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{l} 1 - \text{una sola proprietà o sostanza,} \\ \text{rappresentativa e facile da misurare} \\ 2 - \text{molte o tutte le proprietà o sostanze} \end{array} \right\}$
--	--

Nello studio e nella “validazione” del processo di disinfezione la strategia corrente è quella C-1. In estrema sintesi, nella massa di rifiuti che si vuole sterilizzare si sistemano una o più fiale chiuse che contengono degli *indicatori biologici* – solitamente delle spore batteriche, in quanto sono la forma più resistente dei batteri – che hanno un comportamento noto e riproducibile; dalla frazione di questi che sopravvive si ricostruisce l'efficacia dell'operazione sull'intera massa, sulla quale non si esegue nessuna misura. La Norma di riferimento, in ambito nazionale, per tali indicatori è la UNI EN ISO 14161:2009.

Nella disinfezione i tentativi con la strategia A o B sono pochissimi; a conoscenza degli scriventi un tentativo recente di utilizzare la strategia A-1 è stato portato a termine dal gruppo di ricerca di Oliveira e coll. (Oliveira et al., 2010). Tale gruppo condusse una campagna di esperimenti di trattamento con MO di rifiuti sanitari pre-sterilizzati in autoclave e successivamente ri-contaminati con spore di *Bacillus subtilis*, utilizzando densità di potenza di 100, 150 e 200 W kg⁻¹ e umidità del campione del 40, 50 e 60%. All'origine di questa sperimentazione era il dubbio che l'ambiente fisico e chimico delle fiale o delle strisce inducesse le spore a comportarsi in modo diverso da quelle dei batteri aderenti ai rifiuti.

1.1. Tecniche correnti per la sterilizzazione

La Norma UNI 10384-1(1994) definisce il processo di sterilizzazione come “Insieme delle fasi, compresi eventuali pretrattamenti del carico ed il caricamento e lo scarico della sterilizzatrice, idonee al raggiungimento della sterilità del carico”. Per sterilità la suddetta norma intende la “condizione di assenza di microorganismi, inclusi sporigeni e virus, in grado di riprodursi”.

In Italia, secondo la Farmacopea Ufficiale XII edizione (2008) e secondo il d.p.r. 254/2003 il trattamento di sterilizzazione deve essere in grado di assicurare un abbattimento della carica microbica tale da garantire un livello di sterilità, S.A.L. (Sterility Assurance Level), non inferiore a 10⁻⁶: ciò indica la probabilità di trovare non più di un organismo vivo su un milione nel materiale finale sterilizzato.

A livello internazionale, per la valutazione dell'efficacia di sterilizzazione in ambito sanitario si fa riferimento ai livelli proposti dallo STAATT III, State and Territorial Association on Alternative Treatment Technologies (2005). Il documento scaturito

dalla Conferenza del dicembre 2005, tenutasi a Orlando in Florida (USA), contiene delle raccomandazioni per la valutazione dell'efficacia dei trattamenti di riduzione della carica batterica:

- per le *spore batteriche* è richiesta una riduzione media di $4 \log_{10}$ e una riduzione minima di qualunque singolo campione testato di $2 \log_{10}$;
- per le *cellule vegetative di micobatteri* è richiesta una riduzione media di $6 \log_{10}$ e una riduzione minima di qualunque singolo campione testato di $3 \log_{10}$.

Per la sterilizzazione dei RSP-I in ambito ospedaliero – la situazione che qui interessa – la tecnica tradizionale, soddisfacente, largamente impiegata è il *trattamento con calore umido*, in particolare a vapore saturo, in autoclave. In ambito europeo (Farmacopea Europea, 2016) è stabilito per questo tipo di sterilizzazione che il tempo di residenza del rifiuto processato all'interno delle autoclavi sia di 6-8 minuti alla temperatura di 134°C oppure di 15-20 minuti a 121°C .

Tale metodo è collocato nei processi termici a bassa temperatura perché usa l'energia termica per l'inattivazione microbica ma non raggiunge le temperature necessarie per rompere i legami chimici delle molecole (pirolisi). L'inattivazione in pratica è la degradazione dei componenti della membrana e della parete cellulare e la denaturazione degli acidi nucleici, degli enzimi e delle proteine, fino alla morte della cellula.

Nel trattamento con MO il riscaldamento è generato in modo volumetrico dall'interno del materiale. Materiali diversi rispondono in maniera diversa alle microonde; in alcuni l'effetto può non limitarsi a far “vibrare” le molecole, ma essere più drastico. In certe condizioni cioè le MO possono rompere dei legami chimici instabili e così modificare la composizione dei materiali.

Nelle applicazioni pratiche delle MO, per poter prevedere gli effetti sono fondamentali: a) la pre-omogeneizzazione dei materiali, e b) una razionale progettazione della camera (cavità risonante) in cui il materiale – che nel nostro caso è il rifiuto – è posizionato (nei processi discontinui); oppure è fatto passare (nei processi continui). Vedi Appleton et al., 2005; Veronesi et al., 2007; Zimmermann, 2017.

1.2. Tecnologia a microonde

Le microonde sono radiazioni elettromagnetiche (EM) con frequenze che ricadono nel campo 300 MHz ÷ 300 GHz; a queste frequenze corrispondono lunghezze d'onda da 1 m a 1 mm; hanno la ca-

pacità di penetrare i materiali dielettrici producendo effetti termici e non termici. I microrganismi assorbono l'energia delle microonde a livello di molecole cellulari e naturalmente dell'acqua di costituzione. La quantità di energia assorbita dipende dalla costante dielettrica e dalla conduttività elettrica di queste cellule (Jancović et al., 2014).

Diversi Ricercatori hanno avanzato l'ipotesi che nella disinfezione le microonde associno due meccanismi di azione:

- uno tradizionale, ossia le MO nelle sostanze umide producono calore, fino a trasformare l'acqua in vapore (effetto termico);
- uno loro caratteristico, ossia le MO trasferiscono energia direttamente ai tessuti viventi, e questo effetto può essere esaltato fino a danneggiare deliberatamente le cellule (effetto non termico).

Sugli effetti delle microonde sulle spore di ceppi batterici scelti come riferimento sono stati effettuati numerosi studi.

Alcuni risultati hanno corroborato l'idea che l'inattivazione delle spore sia prevalentemente legata al calore indotto dalle microonde, mentre è marginale il contributo degli effetti non termici (vedi p.es. Jeng et al., 1987; Banana et al., 2013). Gli esperimenti condotti da Celandroni et al. (2004) concordano con questa conclusione. Questi Autori sottoposero delle spore di *B. subtilis* a un campo EM appositamente generato in modo tale da poterne misurare esattamente la potenza, una preoccupazione che si ritrova nel lavoro di Veronesi (Veronesi et al., 2007).

Celandroni e coll. dimostrarono che la perdita di acido dipicolinico provocata dal calore è molto più grave di quella provocata dalle MO. Le fotografie al microscopio elettronico confermarono che la corteccia delle spore sottoposte al vapore era assottigliata e rilassata in misura quattro volte maggiore di quelle sottoposte alle MO.

L'ipotesi di inattivazione dei batteri per danno fisico è sostenuta sperimentalmente da Ojha e coll. (2016). Le fotografie fatte da questi Autori al microscopio elettronico di spore di *Clostridium difficile* sottoposte alle MO mostrano degli effetti “macroscopici” sulla parete cellulare che il solo riscaldamento con vapore non provoca. Le cellule appaiono direttamente danneggiate; nel citoplasma possono esserci aree coagulate; talvolta nella membrana cellulare si sono aperti degli squarci.

Questa possibilità di danneggiamento fisico-chimico era già stata dimostrata da un gruppo di Ricercatori (De Pomerai et al., 2003) che aveva condotto esperimenti *in vitro* con soluzioni acquose di

siero bovino. In questi esperimenti le microonde causarono un piccolo ma consistente effetto di aggregazione nelle proteine anche senza variazioni misurabili di temperatura.

Infine, l'articolo di M. Bhattacharjee e J. Delsol pubblicato nel 2014 si distacca dai due filoni principali propendendo invece per un meccanismo di inattivazione chimico. Questo è stato da loro studiato coltivando una precisa specie Gram-negativa e anaerobia facoltativa, lo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Le Autrici partirono dalla constatazione fatta da una di loro nel 2009: che cioè il terreno di coltura dello *A. actinomycetemcomitans* ha un effetto inibitore sulle cellule allorquando nella fase di preparazione è stato portato all'ebollizione. Per questo effetto non fa differenza che siano state usate MO oppure vapore.

Bhattacharjee e Delsol ne dedussero che il loro batterio indicatore era inattivato da una sostanza chimica che si era prodotta nel terreno di coltura. Esse fecero l'ipotesi che si trattasse della famiglia di sostanze ("Maillard reaction products", MRP) prodotte dalla cosiddetta Reazione di Maillard, che ha luogo fra aminoacidi e zuccheri riducenti a temperature sopra 140 °C.

Bhattacharjee e Delsol sciolsero in acqua glucosio e lisina come precursori dei MRP, e irraggiarono le beute con MO fino all'ebollizione e dopo ancora per alcuni minuti, ripristinando il livello dell'acqua per compensare l'evaporazione. Le due Ricercatrici provarono così che 1) le MO producevano MRP a una velocità quadrupla dell'ebollizione su piastra scaldante, e 2) un terreno di coltura trattato in questo modo dava luogo a crescite di colonie molto ridotte.

Con lodevole scrupolo Bhattacharjee e Delsol nel loro articolo precisarono che *E. Coli*, usato come specie di confronto, non sembrava soffrire di alcuna inattivazione.

Alla luce delle ricerche che sono state qui riassunte, non meraviglia che il dibattito sul meccanismo d'azione prevalente ai fini dell'inattivazione batterica sia ancora aperto.

Dal punto di vista applicativo, i principali vantaggi della tecnologia a MO sono:

- facilmente applicabile dal personale ospedaliero;
- adottando le giuste precauzioni, le emissioni sono ridotte al minimo;
- la tecnologia è automatizzata e facile da usare, anche se richiede la presenza di un operatore.

Questo trattamento ha anche degli svantaggi tra i quali:

- i rifiuti solidi possono essere trattati solo se triturati;
- oggetti metallici eventualmente presenti nei rifiuti potrebbero generare degli *hot spot* per effetto della riflessione delle microonde;
- non possono essere trattati i composti organici volatili, i rifiuti provenienti da chemioterapia, il mercurio, e i rifiuti radioattivi (WHO, 2014).

Vi sono inoltre pareri discordanti in merito alla convenienza economica del trattamento a MO: alcuni considerano i suoi costi operativi inferiori a quelli delle altre tecnologie (Soares et al., 2013), mentre altri ritengono i costi di investimento e di manutenzione relativamente alti soprattutto se il rifiuto ha un elevato contenuto di metalli (Appleton et al., 2005).

1.3. Procedure di verifica dell'efficacia del trattamento

Nello studio e nella "validazione" del processo di disinfezione la strategia corrente è quella definita "C-1" nell'introduzione, consistente in pratica nell'introdurre appositamente nell'intera massa un campione confinato (in pratica, una fiala o una striscia) di una sola specie microbica, rappresentativa e facile da "contare" dopo ordinarie operazioni di incubazione.

I risultati si esprimono con la "frazione di inattivazione", definita e calcolata con l'espressione:

$$X(\%) = \frac{N_{or} - N}{N_{or}} \quad (1)$$

dove N_{or} è il numero di micro-organismi recuperati dal campione di controllo (non irraggiato); N è il numero di organismi recuperati dai campioni irradiati. Se si mette in atto la strategia di controllo A-1, appaiono evidenti tre fatti:

- 1) il calcolo di X è concettualmente corretto solo sotto l'ipotesi che il "lavaggio" del campione abbia esattamente la stessa efficacia sui rifiuti irraggiati e su quelli non irraggiati. Questa parte è variabile e imprevedibile;
- 2) di contro, nei rifiuti irraggiati il "lavaggio" del campione non può staccare dalla superficie dei rifiuti quelle spore che siano state eventualmente intrappolate in frammenti rammolliti dal calore;
- 3) a causa dell'inserimento della fase di lavaggio nella sequenza di operazioni di verifica del "livello di inattivazione", questa tecnica richiede più tempo, lavoro e materiali rispetto a quella delle spore confinate in fiale.

Nel "lavaggio" del campione con la soluzione fisiologica; restando sui campioni di controllo, non

irraggiati; Oliveira e coll. ottennero “percentuali di recupero” delle spore – inizialmente distribuite nella massa – comprese fra 72 e 93% (Oliveira et al., 2010). Questo introduce un fattore di incertezza nell’intera procedura.

Riteniamo che queste percentuali di recupero relativamente alte furono ottenute da Oliveira e coll. grazie all’aggiunta di un tensioattivo all’acqua di lavaggio: questi Autori infatti riferiscono di avere utilizzato “un detergente commerciale nelle proporzioni di quattro gocce a litro”. Nei nostri esperimenti si è rinunciato a questo ausilio; in parte per verificare quanto esso sia importante, e in parte per potere escludere interferenze con la successiva coltivazione delle spore su piastra in terreno di coltura BHI (*Brain Heart Infusion*). Su questo punto si tornerà nella sezione “Discussione”.

Il confronto di questa procedura con quella delle spore confinate fu pubblicato da due degli stessi Autori nel 2015 (de Oliveira e Pisani Jr., 2015). Alcune ampole contenenti le spore in mezzo di coltura BHI furono collocate a tre altezze diverse dal fondo del contenitore con il campione da irradiare: una sul fondo, una a mezza altezza (centro geometrico) e una sulla superficie. Le condizioni sperimentali erano le stesse del 2010.

Questa campagna di esperimenti può essere così riassunta:

- il livello di sterilizzazione “4 log₁₀” non fu mai raggiunto, né nelle ampole né nella massa;
- il livello migliore fu raggiunto nelle ampole, e fu 99,8% (cioè circa “3 log₁₀”); per le spore disperse nella massa superò di poco il 70%;
- per le ampole allungare il tempo di esposizione da 20 a 40 min produce dei benefici solo marginali; per le spore disperse invece si raddoppia l’efficacia;
- lo stesso discorso vale per la potenza applicata: per le ampole la densità di potenza 100 W kg⁻¹ è già sufficiente; per le spore disperse passando da 100 a 200 si raddoppia l’efficacia.

Gli Autori usarono con successo i risultati per calibrare un modello cinetico di inattivazione del 1° ordine. Fatto questo, estrapolando i risultati essi calcolarono che per le spore sospese dentro ampole il livello di sterilizzazione “4 log₁₀” sarebbe stato effettivamente raggiunto in 36-37 minuti; con le spore disperse invece sarebbero stati necessari tempi compresi tra 260 e ben 780 minuti.

Da questi risultati è evidente che lo stato fisico del mezzo in cui sono disperse le spore del bioindicatore influenza fortemente il grado di disinfezione raggiunto, a parità di condizioni nell’autoclave.

Poiché le spore disperse in un mezzo liquido sono risultate più facilmente inattivabili dalle microonde rispetto al mezzo solido, si deve concludere che i buoni livelli di sterilizzazione calcolati dall’inattivazione nelle fiale non si ritrovano se si vuole applicarli all’intera massa.

In questa ricerca si è voluto provare a riprodurre quegli esperimenti con un campione sintetico rappresentativo di un rifiuto ospedaliero, utilizzando – come specie indicatrici – delle spore batteriche distribuite nell’intera massa, e come agente di disinfezione le microonde.

Gli esperimenti di disinfezione sono stati condotti con lo scopo di identificare i passaggi critici ai fini della riproducibilità dell’intero processo e potere quindi intraprendere un percorso di validazione che ponga questo metodo sullo stesso piano di quello standard attuale. Obiettivo specifico della ricerca è stato, dunque, quello di valutare il livello di sterilizzazione raggiunto dai campioni.

L’utilizzo di spore inoculate in modo distribuito nel campione di rifiuto, appositamente preparato, è un modo di simulare la presenza di organismi patogeni nei rifiuti infettivi che aderisce meglio alla realtà, rispetto alla modalità di utilizzare ampole/fiale di coltura posizionate in diversi punti nel campione.

L’utilizzo delle microonde nel campo sanitario risale agli anni ’50 per le applicazioni terapeutiche (Guy, 1984); l’utilizzo specifico nel trattamento di rifiuti sanitari è degli anni ’90. Ad es. è del 1975 un brevetto statunitense di un apparecchio per la sterilizzazione con MO di fiale contenenti liquidi (Murayama et al., 1975). Una ripresa dell’interesse indirizzata ai rifiuti è dimostrata circa vent’anni dopo dal deposito di un brevetto su un metodo per processare rifiuti infettivi con MO (Brent, 1992) e da quello sull’uso combinato delle MO e del vapore sotto pressione (Drake, 1993).

In effetti diverse apparecchiature in piena scala presenti oggi in commercio si basano sull’azione combinata di MO e vapore saturo sotto pressione.

Per raggiungere alte efficienze del trattamento sono necessari sia la pre-triturazione che il condizionamento con vapore: la prima perché riduce la tessitura del rifiuto e migliora la sua esposizione; il secondo perché favorisce l’*effetto termico*.

Alcune ricerche dimostrano che il pre-miscelamento/triturazione dei RSP-I riduce i tempi di trattamento richiesti nella sterilizzazione a vapore (Maamari et al., 2016).

L'effetto "termico" sembra prevalere (Vela e Wu, 1979; Bryant et al., 2007) su quello "non termico" (Jancović et al., 2014) cioè di azione diretta delle MO in particolare sulle pareti cellulari (Woo et al., 2000). L'effetto delle MO sulle strutture cellulari differisce però da quello causato da un riscaldamento con mezzi tradizionali (Celandroni et al., 2004) ed inoltre l'uso combinato di MO e vapore saturo sotto pressione sembra instaurare un meccanismo di trasporto di massa che genera una dinamica particolare tale da favorire l'azione sterilizzante (Drake, 1993).

2. MATERIALI E METODI

2.1. Esperimenti a scala di laboratorio

Nell'ambito universitario al Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale, Aerospaziale, dei Materiali dell'Università degli Studi di Palermo, in collaborazione con il Dipartimento Scienze per la promozione della Salute e Materno Infantile, Scuola di Medicina e Chirurgia della stessa Università, è stata condotta una sperimentazione con i seguenti obiettivi:

- realizzare, a scala di laboratorio, la sterilizzazione di RSP-I mediante il trattamento con microonde individuando gli aspetti critici dell'intera procedura;
- simulare tutte le fasi del percorso di un rifiuto sanitario: dalla contaminazione alla sterilità finale;
- standardizzare i metodi di analisi, al fine di definire un protocollo di laboratorio che permetta di validare in modo riproducibile l'efficacia di tale trattamento.

Sono stati condotti, a questo scopo, numerosi esperimenti su dei campioni sintetici, riprodotti in laboratorio e rappresentativi di un rifiuto ospedaliero, composti da frazione secca, frazione organica e un contenuto di umidità variabile (aggiungendo quantità note di soluzione fisiologica sterile).

Al fine di assimilare tale campione a un rifiuto sanitario pericoloso a rischio infettivo, si è scelto di contaminarlo appositamente con una quantità nota di spore del ceppo batterico *Bacillus pumilus* ATCC 14884 – ceppo acquistato in forma liofilizzata – ritenute in ambito internazionale un buon indicatore biologico per l'inattivazione da radiazioni (STAATT, 2005) essendo caratterizzate da elevata resistenza ambientale. Nell'ambito di tale studio, per ogni sessione di sperimentazione, sono state riprodotte tre tipologie di campioni:

- Tesi T: campioni a contenuto di umidità noto, inoculati con una sospensione nota di spore e sottoposti al trattamento nel forno a microonde;
- K⁺: campioni inoculati con spore ma non trattati con microonde (*controllo positivo*), per la valutazione dell'efficienza di recupero delle spore;
- K⁻: campioni non inoculati e non trattati (*controllo negativo*), per verificare le condizioni di sterilità dei campioni.

Dopo aver verificato le condizioni di sterilità del campione prima dell'inoculo, e irradiato le tesi in un forno a microonde (trattamento in batch), è stata calcolata l'efficienza di inattivazione microbica, sulla base del confronto tra la concentrazione finale e iniziale di colonie di spore presenti.

La relazione matematica utilizzata per tale calcolo è la seguente:

$$E = \left(1 - \frac{C_{fin}}{C_{in}}\right) \times 100 \quad (2)$$

dove:

- C_{fin}: concentrazione di spore finale. In questo caso si parla di spore residue, ossia di spore vitali recuperate nonostante il trattamento con microonde. Esse sono recuperate tramite la procedura di lavaggio della tesi in esame. Il valore C_{fin} si ricava come media a partire dalla lettura di almeno due piastre, relative alla tesi, su cui si sviluppano tali spore.
- C_{in}: concentrazione di spore iniziale. In questo caso si parla di spore recuperate in seguito al lavaggio del campione inoculato ma non trattato (K⁺). Il valore C_{in} si ricava come media a partire dalla lettura di almeno due piastre su cui si sviluppano tali spore.

I campioni, nel forno, sono stati irradiati dalle microonde per 40 minuti al fine di rendere tale metodo confrontabile in termini di tempo di trattamento, con quello tradizionale dell'autoclave con vapore saturo. Tempi maggiori, infatti, non lo renderebbero alternativo a quest'ultimo; tempi minori, invece, non garantirebbero alti livelli di inattivazione microbica, come dimostrato da esperimenti svolti in passato (Insinga, 2014).

Dunque è stata valutata l'efficienza di sterilizzazione (E) mediante l'esecuzione di numerose prove mantenendo costante il tempo di esposizione alle microonde e variando, come parametri di processo, il contenuto di umidità delle tesi e la potenza nominale del forno utilizzato.

Per la determinazione della variazione di umidità dei campioni, a seguito del trattamento con MO, sono stati preparati specifici campioni, ottenuti con

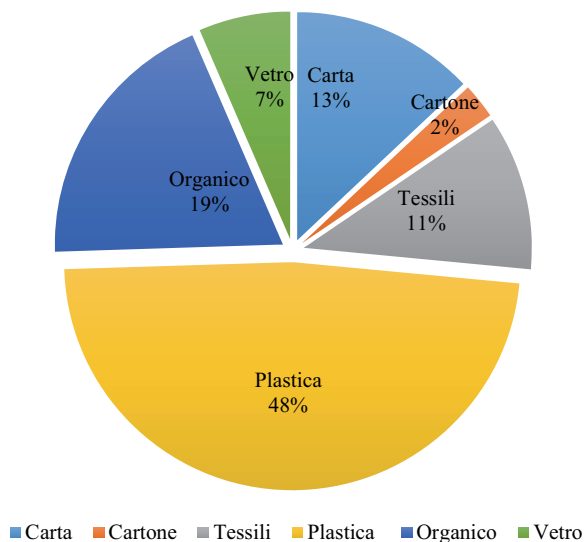


Figura 1/a – Frazioni merceologiche



Figura 1/b – Frazioni merceologiche del campione riprodotto in laboratorio: a) carta; b) cartone; c) tessile; d) plastica dura; e) film di plastica; f) gomma; g) vetro; h) organico

il metodo della quartatura, con umidità 50, 60, 70 e 80% che sono stati sottoposti alle stesse condizioni di irraggiamento delle Tesi.

La variazione di umidità è stata calcolata con la seguente formula:

$$\Delta U\% = \frac{U_f - U_i}{U_i} \times 100 \quad (3)$$

2.1.1. Preparazione di campioni sterili di rifiuti ospedalieri

Sono stati riprodotti in laboratorio i campioni sintetici rappresentativi di un rifiuto ospedaliero, sulla base della composizione merceologica ricavata da dati di letteratura (Fig. 1/a).

I materiali utilizzati, rappresentativi di alcune delle frazioni merceologiche, sono stati:

- carta: coriandoli o ritagli di giornale;
- tessile: lenzuolini monouso in TNT (tessuto non tessuto) per i lettini degli ospedali;
- plastica dura: bottiglie di plastica in polietilene tereftalato (PET);
- film di plastica: imballaggi di plastica dell'acqua o sacchi per bidoni;
- gomma: guarnizioni;
- organico: scarti alimentari, in particolare bucce di arance e mele.

Si è deciso di escludere dalla composizione del campione tipo la componente metallica poiché presente in quantitativo trascurabile rispetto alle altre. In Figura 1/b sono mostrate le frazioni merceologiche costituenti il campione riprodotto in laboratorio. Dopo aver triturato manualmente le varie frazioni merceologiche, è stata effettuata la caratterizzazione del campione rappresentativo di rifiuto ospedaliero.

Sono state valutate densità apparente (kg m^{-3}) e umidità (%) medie dei campioni da trattare. I valori ottenuti sono stati:

- per la densità apparente $D_{app} = 49,2 \text{ kg m}^{-3}$;
- per l'umidità $U = 11\%$.

Per ricavare la massa totale di un campione di rifiuto, si è partiti fissando un valore di potenza effettiva del forno a microonde pari a 68,34 W (corrispondente al primo livello di potenza nominale, ossia 272 W) e una densità di potenza pari a 350 W kg^{-1} .

Tramite il rapporto delle due grandezze precedenti è stato ricavato un valore di massa totale pari a $M_{tot} = 195,22 \text{ g}$, da ripartire tra massa secca e umidità.

Tale valore è stato mantenuto costante nei vari esperimenti, mentre è stato fatto variare il contenuto di umidità del campione (parametro operativo) e di conseguenza la massa secca e organica.

Per gli esperimenti sono state realizzate delle Tesi con differente contenuto di umidità U dal 25% al 80%, dei K^- con U pari al 50% e dei K^+ con U pari al 50% o uguale a quello delle Tesi. Le sessioni di esperimenti condotte sono state sei, in dettaglio:

- I $\rightarrow P_n = 272 \text{ W}$; $U = 50, 60, 70\%$;
- II $\rightarrow P_n = 272 \text{ W}$; $U = 50, 60, 70\%$;
- III $\rightarrow P_n = 272 \text{ W}$; $U = 25, 80\%$;
- IV $\rightarrow P_n = 528 \text{ W}$; $U = 25, 50\%$;
- V $\rightarrow P_n = 272 \text{ W}$; $U = 60, 70\%$;
- VI $\rightarrow P_n = 272$; $U = 50, 80\%$;

dove P_n indica la potenza nominale del forno a microonde utilizzata e U l'umidità dei campioni sottoposti a irraggiamento. Le sessioni II, III, V e VI sono quelle che hanno dato risultati utili.

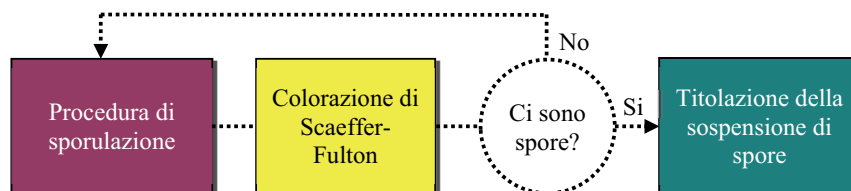


Figura 2 – Procedura microbiologica

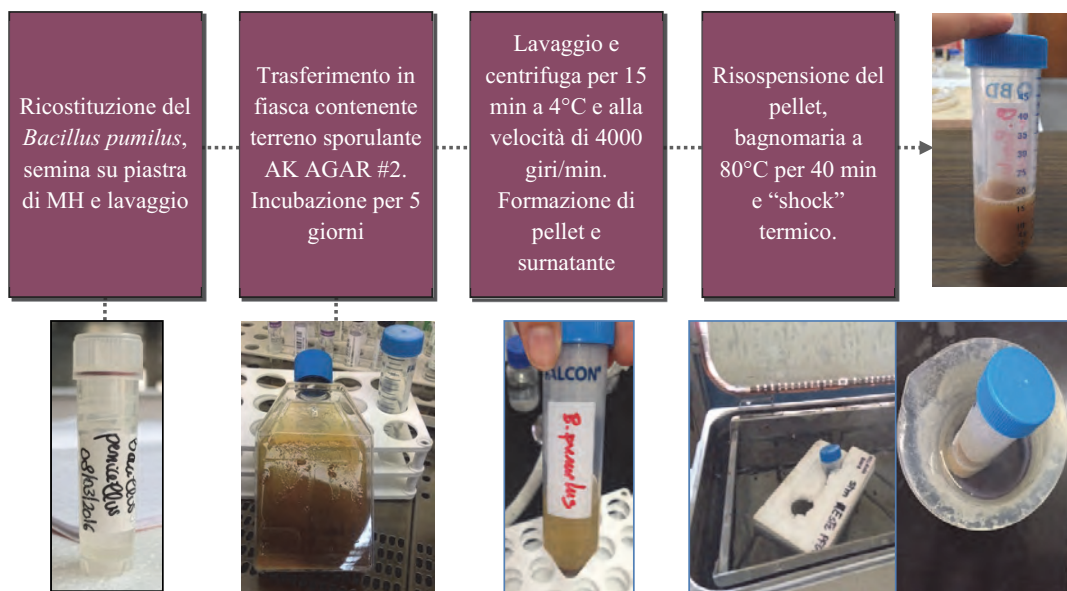


Figura 3 – Procedura di sporulazione

2.1.2. Preparazione di campioni contaminati artificialmente

Nella Figura 2 è mostrato lo schema di produzione delle spore partendo da una coltura pura di *B. pumilus*.

La procedura di sporulazione ha previsto le fasi riportate in Figura 3.

In tale procedimento lo shock termico finale consente l'attivazione delle spore.

Per verificare l'avvenuta sporulazione è stata adoperata la colorazione differenziale di Schaeffer – Fulton (Tortora et al., 2016).

Questa tecnica permette di distinguere le spore, colorate in verde, dalle cellule vegetative (colorate in rosso).

La colorazione prevede l'utilizzo del Verde malachite (colorante principale) per la colorazione delle spore e la Safranina (colorante secondario) per la colorazione delle cellule vegetative.

Osservando il preparato al microscopio ottico con ingrandimento di 1000x, mediante immersione in olio minerale, si è potuto verificare la presenza delle spore, di forma rotondeggiante e colorate in verde, e dunque l'avvenuta sporulazione.

Prodotta la sospensione e verificata l'avvenuta sporulazione, l'ultimo passo compiuto è stato la titolazione della sospensione, ossia la valutazione della concentrazione, espressa in CFU ml⁻¹ (dove CFU indica Unità Formante Colonia), mediante quantificazione su piastra (Fig. 4).

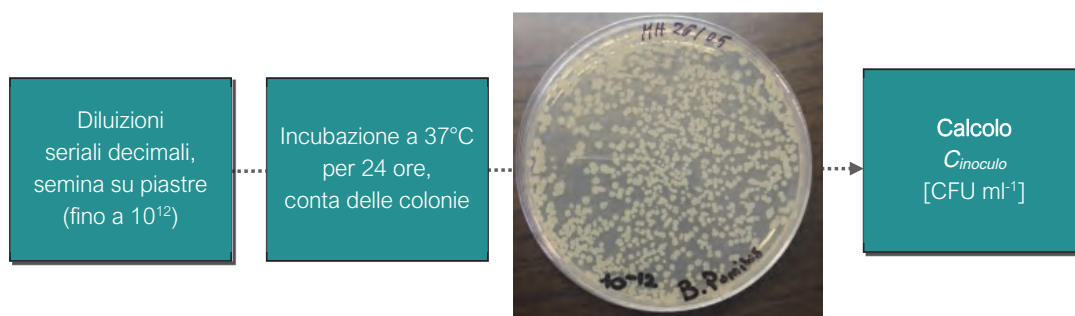


Figura 4 – Titolazione della sospensione di spore

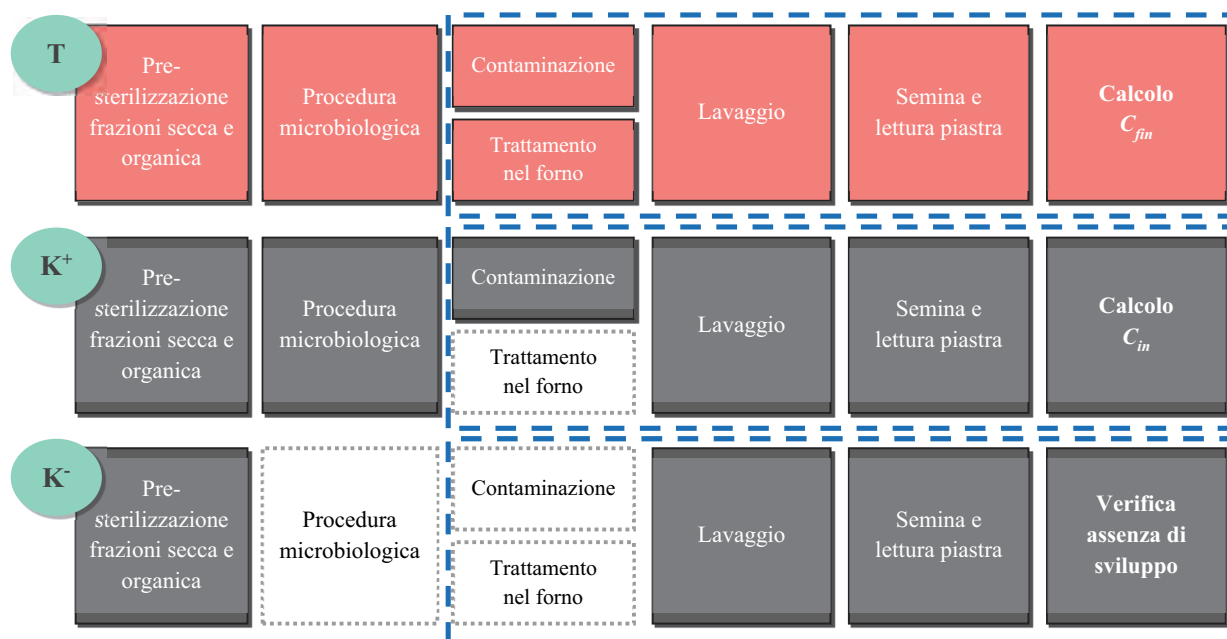


Figura 5 – Procedure seguite per Tesi, K⁺ e K⁻

La concentrazione della sospensione di spore nell'inoculo è stata calcolata, tenendo conto del fattore di diluizione F_D , nel seguente modo:

$$C_{inoculo} = N \cdot F_D \quad (4)$$

dove N è il numero di colonie contate su piastra (CFU ml⁻¹).

Le procedure seguite per le tesi, K⁺ e K⁻ sono mostrate in Figura 5 dove: le fasi contenute nel riquadro tratteggiato costituiscono il reale trattamento; i blocchi grigi le fasi/procedure per i controlli; i blocchi senza sfondo fasi/procedure non eseguite.

Le frazioni secca e organica sono state ripartite, mediante singola pesatura delle frazioni merceologiche, in sacche autoclavabili in base al contenuto di umidità U e sono state pre-sterilizzate a 121°C per 20 minuti in autoclave al fine di eliminare qualunque forma di contaminazione prima della seduta di sperimentazione.

La pre-sterilizzazione delle due frazioni è stata effettuata in due momenti diversi. Quella della frazione secca è stata realizzata qualche giorno prima dell'esperimento per permetterne l'essiccazione per 4-5 giorni; quella della frazione organica, invece, il giorno stesso per evitare che una successiva essiccazione, anche a temperatura ambiente, potesse comportare l'insorgere di muffe.

L'essiccazione della frazione secca è stata realizzata in un incubatore a 37°C per la rimozione dell'umidità conferitagli dal vapore saturo dell'autoclave.



Figura 6 – Procedura seguita per il calcolo dell'efficienza di sterilizzazione

Nello schema precedente sono riportate le varie fasi della procedura seguita per la valutazione dell'efficienza di sterilizzazione (Fig. 6).

2.1.3. Calibrazione del forno

Il forno utilizzato per gli esperimenti è stato un FIMAR, modello ME/1630 – EASYLINE, forno di tipo "domestico" caratterizzato da un sistema di funzionamento *rotawave* (costituito da una ventola di distribuzione delle microonde rotante posta sul tetto), dalla potenza nominale (P_n) massima 1600 W, frequenza 2450 MHz e dimensioni della cavità del forno (330 x 345 x 219 mm). Il forno è stato utilizzato alla potenza nominale di 272 W per le prove di sterilizzazione, mentre per la calibrazione si è fatto uso di tutti e cinque i livelli di potenza selezionabili. La procedura di calibrazione è servita a calcolare la potenza effettiva (P_e), ossia quella realmente as-

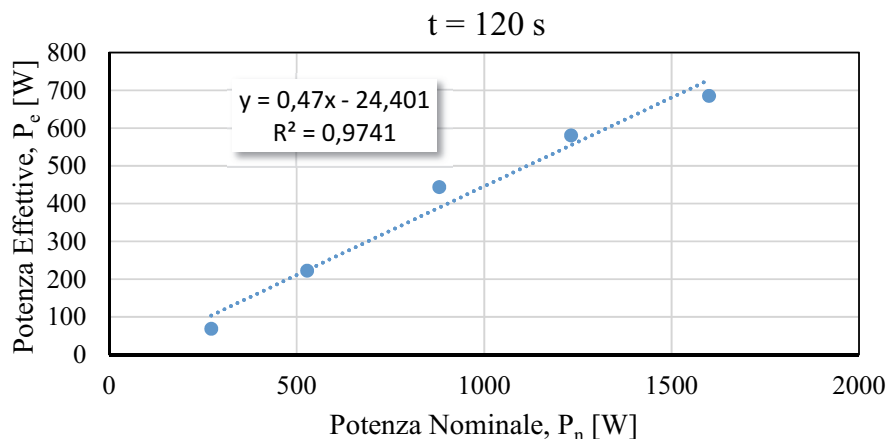


Figura 7 – Potenza nominale (P_n) e potenza effettiva (P_e) per $t=120s$

sorbita dal campione durante il periodo di permanenza all'interno del forno. Essa è dipendente dai parametri relativi al forno e al campione di sostanza utilizzata e dalla geometria del contenitore (Houšová e Hoke, 2002).

Le prove di calibrazione sono state condotte utilizzando un becher in vetro pyrex di capacità 2 litri, un campione di acqua distillata di 1 litro e un termometro a mercurio, e variando il tempo di esposizione alle microonde e le potenze nominali. Sono stati scelti due tempi: $t = 120$ s (IMPI, 1991) e $t = 240$ s.

Per ciascuna prova è stato calcolato il valore di potenza effettiva utilizzando l'espressione:

$$P_e = \frac{M_a \cdot c_{p,a} \cdot \Delta T}{t} \times 1000 \quad (5)$$

Dove:

- P_e è la potenza effettiva (ossia quella assorbita dal campione d'acqua) [W];
- M_a è massa dell'acqua [kg];
- $c_{p,a}$ è il calore specifico dell'acqua [$\text{kJ kg}^{-1} \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$];
- ΔT è la differenza di temperatura dell'acqua prima e dopo il riscaldamento [$^\circ\text{C}$];
- t è il tempo di esposizione alle microonde [s].

Nell'equazione 5 si è trascurato il contributo dato dal vetro pyrex (vetro borosilicato).

Lo standard IEC 705 (1988), il più diffuso in Europa, stabilisce, invece, di fissare un determinato aumento di temperatura e misurare il tempo per conseguirlo. Per ragioni pratiche è stato scelto di utilizzare lo standard americano come sopra descritto.

In Figura 7 è mostrato l'andamento della potenza effettiva in funzione di quella nominale per $t=120$ s, quello relativo a $t = 240$ s è sovrapponibile ad esso.

2.1.4. Trattamento di sterilizzazione con microonde e controlli

Successivamente è stato preparato il materiale: sono stati sterilizzati becher da 2 e 3 litri ed è stata prodotta e sterilizzata una soluzione fisiologica (SF) allo 0,9% ossia una soluzione salina contenente cloruro di sodio (NaCl) allo 0,9% in acqua distillata. Essa, nell'ambito di tale studio ha costituito l'umidità di ogni campione ed è stata utilizzata nella fase di lavaggio per il recupero delle spore residue, vitali nonostante il trattamento.

Le procedure microbiologiche seguite per le Tesi, i K^+ e i K^- sono schematizzate in Figura 8 (a pagina seguente): in alto per il campione inoculato e irradiato (Tesi); al centro per il campione inoculato e non irradiato (K^+); in basso per il campione non inoculato e non irradiato (K^-).

Successivamente è stato effettuato il lavaggio del campione per il recupero delle spore.

È stato necessario, innanzitutto, trasferire il campione in un becher da 3 l. Il volume limitato del becher utilizzato per l'inoculo e il trattamento della tesi, infatti, non è adatto anche al lavaggio.

Il lavaggio del campione è stato realizzato in condizioni sterili, all'interno di una cabina biologica di classe II, con agitazione manuale mediante una pipetta sterile da 10 ml per 20 minuti, decantazione per 10 minuti e successiva rapida agitazione per qualche minuto, al fine di far trasferire il più possibile le spore dal rifiuto alla SF di lavaggio.

Dai becher contenenti le Tesi e i K^+ sono stati così prelevati sterilmente 100 μl della sospensione contenente le spore residue mediante una micropipetta, previa agitazione, e sono state effettuate delle diluizioni seriali in apposite provette da 15 ml di tipo Falcon.

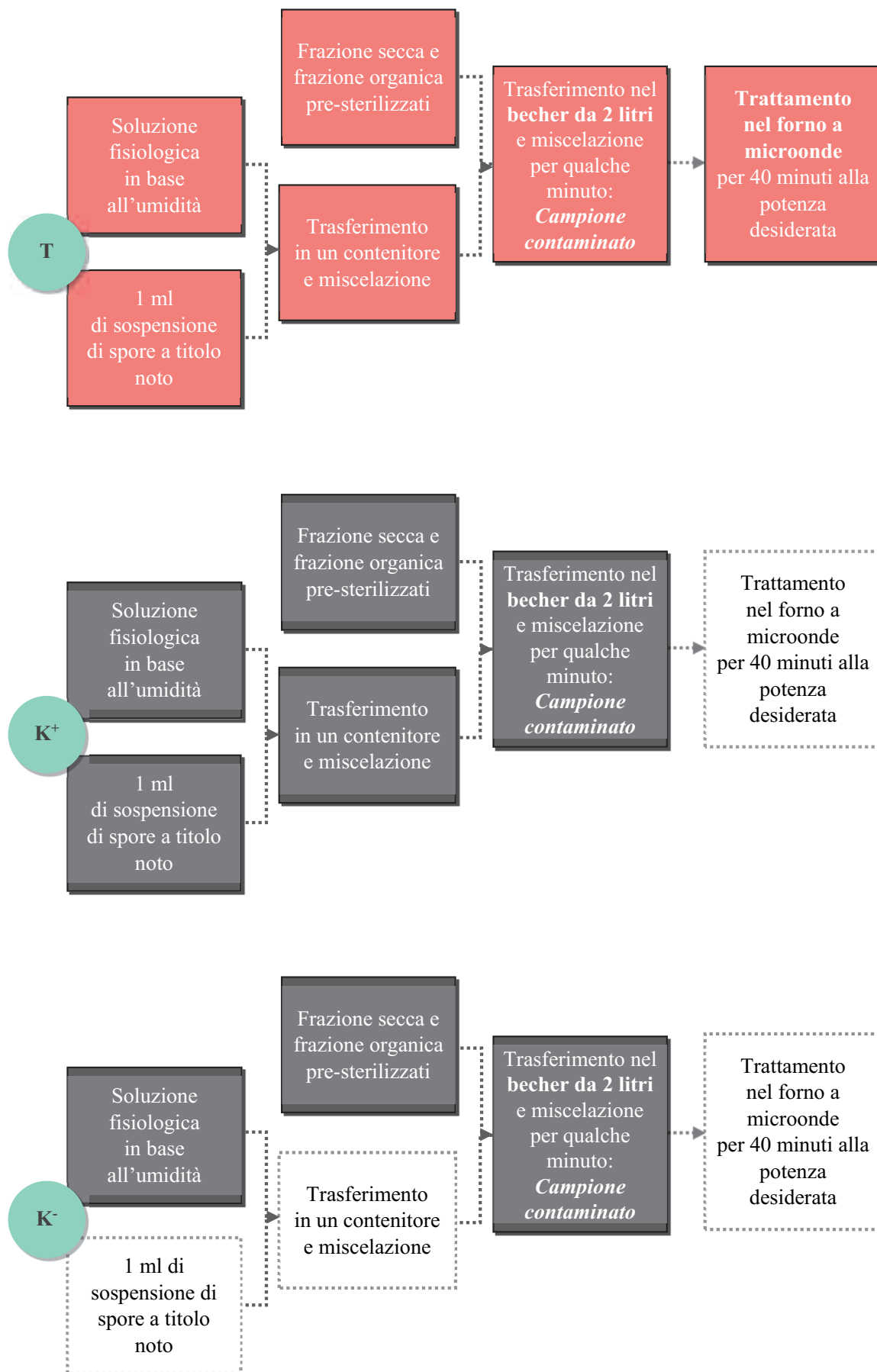


Figura 8 – Procedure microbiologiche. In alto: procedura per la Tesi (campione inoculato e irradiato). Al centro: proced. per il K⁺ (camp. di controllo, inoculato e non irradiato). In basso: proced. per il K⁻ (camp. di controllo, non inoculato e non irradiato)

Si è deciso di diluire la sospensione fino a 10^{-6} . Ottenute le soluzioni diluite, 100 μl sono stati inoculati su piastre di Petri contenenti agar Mueller-Hinton (MH) ottenendone un'ulteriore diluizione seriale in base 10.

Le piastre relative alle diluizioni 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} sono state incubate in un termostato a 37°C per 24 ore per permettere lo sviluppo delle colonie. Dai becher, contenenti i K^- , invece sono stati prelevati 100 μl della sospensione e seminati direttamente su piastra, omettendo il passaggio delle diluizioni seriali. Anche tale piastra è stata posta a incubazione in un termostato a 37°C per 24 ore.

Dopo l'incubazione è stata effettuata la lettura delle piastre relative alle Tesi, ai K^+ e K^- .

L'assenza di sviluppo batterico nel K^- ha dimostrato assenza di contaminazione nei materiali utilizzati.

Successivamente si è passati alla lettura delle altre piastre mediante la conta delle colonie in quelle che ne presentavano un numero facilmente contabile (Fig. 9).

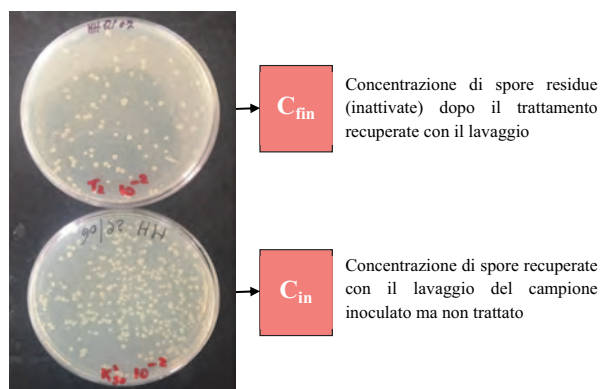


Figura 9 – Piastre relative alla Tesi (in alto) e al K^+ (in basso) utilizzate per la conta delle colonie in uno degli esperimenti

Dopo la conta delle colonie è stata calcolata, per ciascuna coppia (Tesi e K^+), il valore della concentrazione di spore recuperate C_R [CFU ml^{-1}], mediante la seguente relazione che tiene conto dell'ulteriore diluizione ottenuta con i 2 l, ossia $2 \cdot 10^3$ ml, di SF durante la fase di lavaggio.

$$C_R = N \cdot F_D \cdot 2 \cdot 10^3 \quad (6)$$

La concentrazione C_R della formula 6 corrisponde, quindi, a C_{fin} per la Tesi e a C_{in} per il K^+ .

Tutti i campioni sono stati seminati in doppio e la conta delle colonie è stata effettuata calcolando il valore medio della lettura delle due piastre. Per ciascuna tesi è stata, così, valutata l'efficienza di inattivazione microbica E [%], indicativa dell'efficacia del trattamento di sterilizzazione tramite la formula 2.

È importante sottolineare che il confronto fra concentrazione iniziale e finale è in realtà effettuato non usando $C_{inoculo}$, bensì il valore di concentrazione di spore K^+ (C_{in}), per tenere conto della perdita di spore ottenuta durante la fase di lavaggio.

Naturalmente il lavaggio è stato effettuato in maniera identica nelle due procedure al fine di avere una situazione di conformità. Se il lavaggio fosse efficace al 100%, si otterrebbe una C_{in} pari a quella dell'inoculo.

3. RISULTATI

Di seguito si riportano nella Figura 10 gli andamenti della temperatura finale e della variazione di temperatura del campione in funzione dell'umidità crescente, misurate durante le sessioni II, III e V, VI. Le temperature iniziali, rispettivamente, si attestano circa sui 28°C e 30°C .

Nel caso delle sessioni di esperimenti II e III il controllo positivo K^+ (campione inoculato ma non trat-

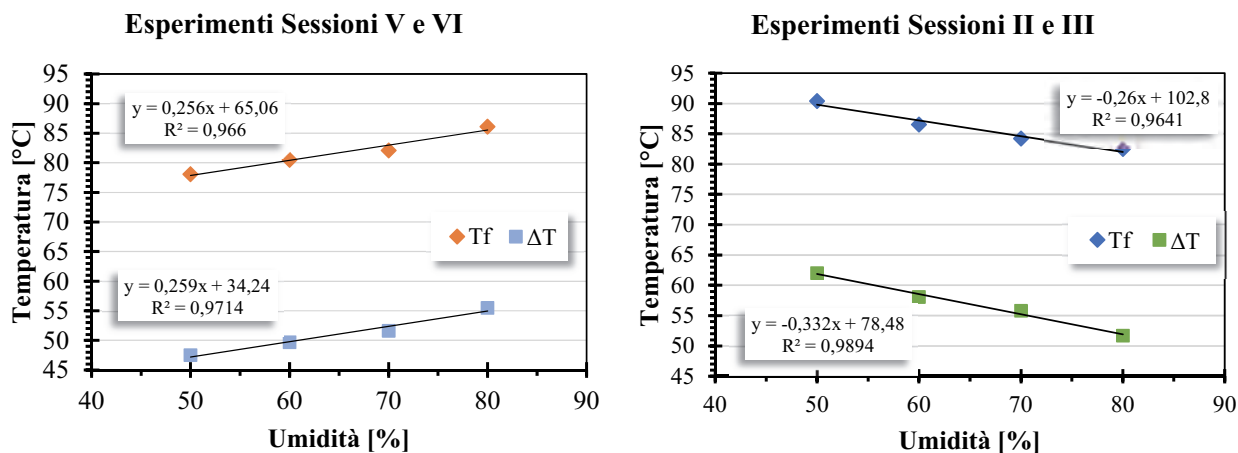


Figura 10 – Andamento di T_f e ΔT in funzione di U

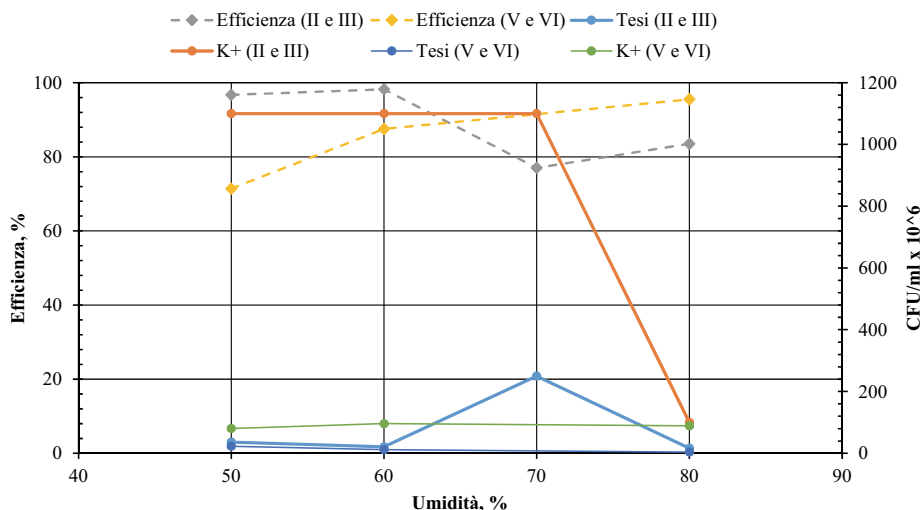


Figura 11 – Efficienza del trattamento (asse sx) e concentrazione di spore per i campioni irradiati (Tesi) e per il controllo positivo (K⁺) (asse dx) in funzione dell'umidità

tato) è stato effettuato con riferimento esclusivo al campione di umidità pari al 50% in peso. Nel corso della sperimentazione ci si è resi conto dell'opportunità di confrontare le concentrazioni delle tesi con quelle dei controlli positivi eseguiti con la medesima umidità per ottenere dei risultati ancor più attendibili.

Nella Figura 11 si riportano i risultati degli esperimenti in funzione dell'umidità in termini di concentrazione di spore vitali residue (CFU ml⁻¹) per le tesi e per i corrispondenti campioni non irradiati (K⁺), asse delle ordinate destro, e l'andamento dell'efficienza di sterilizzazione, asse delle ordinate sinistro. Come mostrano i grafici riassuntivi degli esperimenti della sessione V e VI, le concentrazioni così riscontrate nei K⁺ dei campioni a differente umidità si attestano sul medesimo ordine di grandezza. Il grafico in Figura 12 mostra i valori del contenuto d'acqua finale del campione nonché la variazio-

ne, espressa in percentuale di tale parametro, calcolate con l'equazione 3, rispetto ai quattro valori di umidità iniziali considerati.

4. DISCUSSIONE

In totale sono state effettuate sei sessioni di esperimenti (numerati come I – VI). In termini di riduzione della carica microbica per effetto delle microonde, i risultati sono stati interessanti ma lontani dall'efficienza della tradizionale autoclave, e inferiori fra l'altro al limite prescritto dallo STAATT (cioè 99,99%) (Benanti, 2016). Il massimo valore è stato 98,2%, ottenuto con un campione al 60% di umidità.

Nello sviluppo degli esperimenti si è deciso di mantenere costante il tempo di esposizione – precisamente 40 minuti – in quanto tale valore corrisponde alla durata di un ciclo di autoclave. Ogni

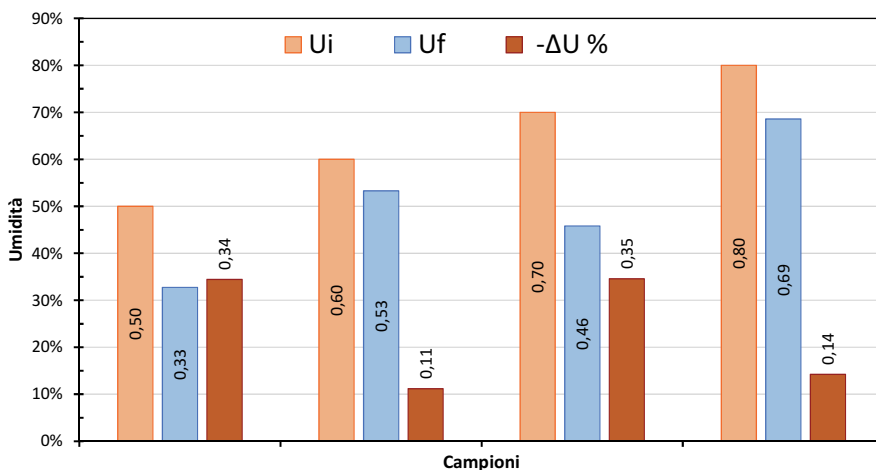


Figura 12 – Umidità finale e variazione di umidità nel campione, per 4 valori di umidità iniziale

esperimento è stato condotto per cinque differenti livelli di umidità del campione (dal 25% all'80%); ma di queste, tutte le prove con l'umidità minima non sono risultate attendibili.

Per calcolare l'efficienza del trattamento con MO per i singoli campioni è stata adoperata la formula 2. Come mostrato nel grafico di Figura 11, nelle sessioni di sperimentazione con umidità del 50-80% i valori dell'efficienza sono stati 71,4-98,2%, che non si possono certo definire alti. Riteniamo che gli errori di varia natura associati alle operazioni di trasferimento e lavaggio del campione – caratteristiche della procedura di determinazione *diretta* della carica microbica – non permettano di arrivare a risultati più precisi.

La tecnica di determinazione *diretta* si compone infatti di tanti passaggi, dei quali trasferimento e lavaggio costituiscono i più critici. Questi sono stati da noi eseguiti in un becher diverso (e più grande) da quello utilizzato per la contaminazione e la sterilizzazione del campione; il travaso però ha comportato una grave perdita di spore rispetto all'inoculo, addirittura di due ordini di grandezza, in termini percentuali il recupero calcolato è risultato sotto il 2%. Evidentemente una consistente parte delle spore rimane adesa alla superficie del campione o anche alle pareti del contenitore, e va riconosciuto che l'aggiunta di tensioattivi alla SF usata per il lavaggio – come fu fatto negli esperimenti descritti in Oliveira et al. (2010) – è un particolare tecnico decisivo per il successo del recupero.

Le perdite di spore nel recupero sono state da noi calcolate confrontando il numero di spore contate nel campione di controllo inoculato e non irradiato (chiamato K^+) con quello dell'inoculo di partenza, prendendo e coltivando il volume di 1 ml. Fatta l'ipotesi che l'operazione di lavaggio del campione di rifiuto 1) sia ripetibile e 2) non risenta della condizione "irradiato / non irradiato", anche l'efficienza è stata calcolata sul numero K^+ , non sul numero di spore costituenti l'inoculo. Quindi i valori di mortalità di cellule (e dunque di efficienza di sterilizzazione) 71,4-98,2%, detti sopra, restano validi.

Sul livello di sterilità raggiunto influisce – a parità di tempo di esposizione – l'aumento di temperatura rispetto a quella ambiente. Questa è l'effetto dell'interazione delle MO con le molecole polari presenti nel campione, principalmente molecole d'acqua sotto forma di umidità.

Per ottenere una relazione fra il riscaldamento occorso e l'umidità del campione sono state misurate le temperature dei campioni di rifiuto prima e dopo il

trattamento a microonde, per data potenza applicata ($P_n = 272 \text{ W}$) e per dato tempo di esposizione (40 minuti). Tuttavia tra le sessioni II e III e quelle V e VI si riscontrano due andamenti diversi (Fig. 10).

Tale incongruenza potrebbe essere conseguenza della precauzione di non misurare la temperatura in un forno a MO con un termometro che abbia una sonda come elemento sensibile: come è noto, infatti, i metalli in questi forni si comportano come conduttori in corto circuito.

Poiché non si disponeva di una micro-camera a raggi infrarossi da collocare nel forno, il becher appena estratto era messo sotto una cappa a flusso laminare, e la sonda era immediatamente immersa al centro del volume di campione, facendo attenzione che fosse a contatto con il rifiuto con la sua umidità residua. Questo percorso non è privo di ritardi, e comunque la priorità è stata l'evitare possibili contaminazioni del campione.

In merito alla variazione di umidità del campione di rifiuto durante l'irraggiamento (al variare di quella iniziale) i risultati degli esperimenti fatti sono di diminuzione del 10-30% circa, ma non forniscono una correlazione attendibile. Non è possibile cioè affermare se un campione inizialmente più umido perda più o meno acqua di uno meno umido (Fig. 12) (Giliberto, 2016).

5. CONCLUSIONI

L'impiego delle microonde per la sterilizzazione dei "rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo" è proposta da alcuni anni come una valida alternativa ai metodi di trattamento tradizionali; in particolare a quello col vapore.

Poiché si ritiene che le MO esplichino sui microorganismi un'azione supplementare rispetto al vapore – azione consistente nel danneggiare direttamente le cellule – è comprensibile che Ricercatori ed Enti di controllo lavorino per accertare quanto sia importante questa parte del processo sterilizzante complessivo.

Nel tentativo di semplificare il quadro, approssimativamente dall'anno 2000 in poi in diversi Laboratori nel mondo si è provato a contaminare dei campioni artificiali usando spore disperse direttamente nel campione, invece che contenute in ampolle.

In questo modo si realizza teoricamente una situazione che rappresenta meglio quella reale; negli articoli pubblicati tuttavia si legge sempre di criticità inerenti la procedura di recupero delle spore.

La nostra campagna di esperimenti ha riguardato contemporaneamente: 1) la determinazione del-

l'efficienza delle MO come mezzo di sterilizzazione di un rifiuto ospedaliero tipico; 2) la possibilità di applicare la tecnica della “contaminazione diretta – recupero delle spore” in modo riproducibile, per calcolare appunto l'efficienza.

I risultati dell'applicazione delle MO per 40 minuti non sono stati brillanti (riduzione non superiore al 98%), considerato che si è lavorato alla scala del laboratorio – dunque senza preoccupazioni per la penetrazione delle MO nel campione – e con densità di potenza effettiva di 350 W kg^{-1} . I risultati migliori sono stati ottenuti con i campioni inizialmente umidi al 60%; fatto che potrebbe confermare la tesi che parte dell'efficacia delle MO è in realtà associata al vapore che esse stesse producono. Incidentalmente, questi risultati sperimentali confermano quelli ottenuti da Oliveira e coll. (Oliveira et al., 2010; Oliveira e Pisani, 2015). Ulteriori ricerche sperimentali potrebbero contribuire non solo a chiarire il meccanismo di azione delle MO sui microorganismi ma anche al superamento degli attuali limiti della tecnologia che utilizza le MO da sole. La tecnica della “contaminazione diretta – recupero delle spore” dal campione di rifiuto, nella nostra campagna di esperimenti ha confermato le sue criticità intrinseche. Questa tecnica richiede fra l'altro 1) grandi quantità di acqua sterile per il lavaggio dei campioni, e 2) l'impiego di personale addestrato in tutte le sue fasi.

Per poter recuperare alte percentuali di spore dai rifiuti irraggiati sembra comunque necessario aggiungere un tensioattivo all'acqua di lavaggio, come riferito nel 2010 da Oliveira e coll. che avevano utilizzato “un detergente commerciale nelle proporzioni di quattro gocce a litro”. Nei nostri esperimenti si è rinunciato a questo ausilio; in parte per verificare quanto esso sia importante, e in parte per potere escludere interferenze del tensioattivo col terreno di coltura BHI nella coltivazione delle spore che segue. Questa scelta non è stata felice.

In una ipotetica applicazione della “contaminazione diretta – recupero delle spore” al controllo di esercizio di un impianto di sterilizzazione, la necessità di maneggiare grandi volumi di acqua non solo graverebbe sulla struttura sanitaria che gestisce l'impianto, ma introdurrebbe un fattore di incertezza per ogni operazione manuale effettuata nella sequenza di: contaminazione per dispersione → lavaggio e recupero → semina → conta su piastra.

La misurazione della temperatura del campione durante e dopo il trattamento a MO è di primaria importanza; per poterla eseguire bisogna attrezzare il

forno con micro-camere a raggi infrarossi, che non interferiscono con le MO. In mancanza di queste, si dovrebbe determinare (e poi applicare) la velocità con la quale il campione si raffredda, e trovare il modo di introdurre il termometro in maniera rapida e riproducibile.

L'adozione di un forno a MO da laboratorio e non di uno domestico per gli esperimenti; oppure il passaggio da una cavità multi-modale a un sistema mono-modale (nel quale le guide d'onda dirigano le radiazioni direttamente sul campione, senza riflessioni dentro la cavità); potrebbero aumentare il potere di controllo del processo e portare a risultati migliori e più riproducibili.

L'eterogeneità del rifiuto sanitario (reale o sintetico) 1) rende più complicata la contaminazione uniforme del campione, e 2) comporta una penetrazione disomogenea delle MO; il calore sviluppato e la temperatura all'interno del becher cambiano dunque da punto a punto, probabilmente abbassando l'efficienza del trattamento.

Peraltro la triturazione preventiva di campioni come questi, che sono fatti per quasi un quarto di plastiche morbide, non può essere ideale; a meno di raffreddare il campione nella macchina, ad es. con “ghiaccio secco” per renderlo duro e fragile. Questa però sarebbe una tecnica da mettere interamente a punto. Nel complesso gli esperimenti da noi condotti in laboratorio suggeriscono di continuare a lavorare per determinare l'efficacia sterilizzatrice delle MO, ma usando come specie indicatrici delle spore in fiala come è tradizionale. Non sembra che attualmente la tecnica della “contaminazione diretta – recupero delle spore” dai campioni di rifiuto, gravata come è dalle numerose indeterminazioni sopra descritte, possa fornire un aiuto verso l'obiettivo principale della ricerca.

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- AA. VV. (2008) Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana XII Edizione. Istituto Poligrafico Zecca dello Stato.
- AA. VV. (2016) Farmacopea Europea (European Pharmacopeia), IX Edizione.
- Appleton T. J., Colder R. I., Kingman S. W. et al. (2005) Microwave technology for energy-efficient processing of waste. *Applied Energy* 81:85-113.
- Banana A. A. S., Norulaini N. A. N., Baharom J., et al. (2013) Inactivation of pathogenic micro-organisms in hospital waste using a microwave. *Journal of Material Cycles and Waste Management* 15(3):393-403.
- Bhattacharjee M.K., Delsol J.K. (2014) Does microwave sterilization of growth media involve any non-thermal effect? *Journal of Microbiological Methods* 96:70-72.

- Benanti L. (2016) Sterilizzazione con microonde dei rifiuti ospedalieri. Standardizzazione dei metodi analitici. Tesi di Laurea Magistrale, Università degli Studi di Palermo, A.A. 2015/2016.
- Brent D.A. (1992) Method for processing infectious waste using microwaves. United States Patent, 5, 124, 125, Jun. 23.
- Bryant S., Rahmanian R., Tam H., et al. (2007) Effects of Microwave Irradiation and Heat on T4 Bacteriophage Inactivation. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI) – M&I UBC* 11:66-72.
- Celandroni F., Longo I., Tosoratti N., et al. (2004) Effect of microwave radiation on *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Applied Microbiology*. 97:1220-1227.
- de Pomerai D.I., Smith B., Dawe A., et al. (2003) Microwave radiation can alter protein conformation without bulk heating. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters* 543:93-97.
- D.P.R. 15/07/2003, n.254 “Regolamento recante la disciplina dei rifiuti sanitari a norma dell’articolo 24 della legge 31 luglio 2002, n. 179”. (GU Serie Generale n. 211 del 11/09/2003).
- Drake R.C. (1993) Apparatus for sterilizing medical waste by microwave autoclaving. United States Patent, 5, 223, 231, Jun. 29.
- Giliberto G. (2016) Sterilizzazione con microonde dei rifiuti ospedalieri. Effetti delle condizioni operative. Tesi di Laurea Magistrale, Università degli Studi di Palermo, A.A. 2015/2016.
- Guy A.W. (1984) History of Biological Effects and Medical Applications of Microwave Energy. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, MTT-32(9):1182-1200.
- Houšová J., Hoke K. (2002): Microwave heating – the influence of oven and load parameters on the power absorbed in the heated load. *Czech J. Food Sci.*, 20(3): 117-124.
- IEC Publication 705 (1988) Methods for measuring the performance of microwave ovens for household and similar purposes. 2th ed. Int. Electrotech. Commis. Geneva.
- IMPI (1991) Report of Standard Committee. International Microwave Power Institute. Clifton (VA), USA.
- Insinga C. (2014) Produzione dei rifiuti sanitati a rischio infettivo in un “Centro Trapianti” e ipotesi di sterilizzazione con microonde. Tesi di laurea magistrale, Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria per l’Ambiente e il Territorio, Università degli di Palermo, A.A. 2013/2014.
- Janković S.M., Milošev M.Z., Novaković M.LJ. (2014) The Effects of Microwave Radiation on Microbial Cultures. *Hospital Pharmacology*. 1(2):102-108.
- Jeng D.K.H., Kaczmarek K.A., Woodworth A.G., et al. (1987) Mechanism of Microwave Sterilization in the Dry State. *Applied and Environmental Microbiology* 53(9):2133-2137.
- Maamari O., Mouaffak L., Kamel R. et al. (2016) Comparison of steam sterilization conditions efficiency in the treatment of Infectious Health Care Waste. *Waste Management* 49:462-468.
- Murayama T. et al. (1975) Apparatus for sterilizing ampoules and reject control system therefor. United States Patent, 3, 880, 586, Apr. 29.
- Ojha S.C., Chankhamhaengdecha S., Singhakaew S. et al. (2016) Inactivation of *Clostridium difficile* spores by microwave irradiation. *Anaerobe* 38:14-20.
- Oliveira E.A., Nogueira N.G.P., Innocentini M.D.M., et al. (2010) Microwave inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores in healthcare waste. *Waste Management* 30:2327-2335.
- Oliveira E.A., Pisani R. Jr (2015) Influência do meio suporte na inativação de endósporos de *Bacillus atrophaeus* em resíduos de serviços de saúde por micro-ondas. *Eng Sanit Ambient* 20(2):289-296.
- Soares S.R., Rodrigues Finotti A., da Silva V.P., Alvarenga R.A.F. (2013) Application of life cycle assessment and cost analysis in health care waste management. *Waste Management* 33:175-783.
- STAATT, State and Territorial Association on Alternative Treatment Technologies (2005) Conference, Orlando (FL), USA, December 5-7, Executive Summary.
- Tortora G.J., Funke B.R., and Case C.L. (2016) *Microbiology. An introduction*. 12th Edition. USA: Pearson Education, Inc.
- UNI (1994) Norma UNI 10384-1:1994 Impianti e processi di sterilizzazione dei rifiuti ospedalieri. Requisiti generali.
- UNI (2009) Norma UNI EN ISO 14161:2009 Sterilizzazione dei prodotti sanitari – Indicatori biologici – Guida per la selezione, l’uso e l’interpretazione dei risultati.
- Vela G.R., Wu J.F. (1979) Mechanism of Lethal Action of 2,450-MHz Radiation on Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 37(3):550-553.
- Veronesi P., Leonelli C., Moscato U., et al. (2007) Non-incineration microwave assisted sterilization of medical waste. *Journal of Microwave Power & Electromagnetic Energy*. 40(4):211-218.
- WHO World Health Organization (2014) Safe management of wastes from health-care activities. II Edition, edited by Y. Chartier et al. Geneva: WHO Press.
- Woo I.-S., Rhee I.-K., Park H.-D. (2000) Differential Damage in Bacterial Cells by Microwave Radiation on the Basis of Cell Wall Structure. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5):2243-2247.
- Zimmermann K. (2017) Microwave as an emerging technology for the treatment of biohazardous waste: A mini-review. *Waste Management & Research*, 35(5): 471-479.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato parzialmente finanziato attraverso il Progetto *SIGLOD – Sistema Intelligente per la Gestione e Localizzazione Ottimale delle Discariche* a valere sull’Asse II del Programma Operativo Nazionale “Ricerca e Competitività”, Italia 2007-2013 – finanziato dall’Unione Europea e dalla Repubblica Italiana in seno al “PON04a2_F – Smart Cities and Communities and Social Innovation”.

I reagenti utilizzati nella Ricerca sono stati acquistati con il Fondo Finalizzato alla Ricerca (FFR) 2012 di Ateneo dei docenti L. Ercoli, S. Nicosia e N. Nocilla, Università degli Studi di Palermo.



INGEGNERIA DELL'AMBIENTE

per il 2018 è sostenuta da:



www.ingegneriadellambiente.net

