

Descrizione di un software per la valutazione dell'effetto degermante di processi di sterilizzazione con il calore in condizioni non standard.

Description of a software for the evaluation of the antimicrobial effect of sterilization processes by means of moist heat under non-standard conditions.

E. LENCIONI, V. TRAVAGLI, C. FRANCHI

*Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico
Università degli Studi di Siena*

Estratto da: «Acta Technologiae et Legis Medicamenti»
Vol. V — N° 3 — settembre/dicembre 1994

CASA EDITRICE MACCARI — PARMA

Descrizione di un software per la valutazione dell'effetto degermante di processi di sterilizzazione con il calore in condizioni non standard*.

Description of a software for the evaluation of the antimicrobial effect of sterilization processes by means of moist heat under non-standard conditions.

E. LENCIONI, V. TRAVAGLI, G. FRANCHI

*Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico
Università degli Studi di Siena*

Riassunto: I parametri conosciuti e comunemente applicati per la determinazione dell'effetto degermante (F_0 , T_{rif} , D , z) dipendono strettamente dalle condizioni del processo; pertanto risulta importante approfondire e quantificare tali correlazioni per valutare correttamente il reale andamento di un processo di sterilizzazione.

A questo scopo abbiamo elaborato un programma di calcolo, gestito da un software opportunamente sviluppato ed in grado di fornire i valori di abbassamento degli esponenti della carica microbica che meglio descrivono il grado di degermazione conseguito nella pratica, anche in autoclave non saturo di vapore. I risultati ottenuti lasciano ben sperare per l'applicazione del nostro software alla determinazione della cinetica di degermazione e, quindi, per la convalida di processi di sterilizzazione in condizioni non standard.

Summary: Known and commonly used parameters for the evaluation of antimicrobial effect (F_0 , T_{rif} , D , z) closely depend on the process conditions. It is therefore important to obtain a correct quantitative evaluation of the real trend of the sterilization process.

* Lavoro presentato al XIV Simposio A.D.R.I.T.E.L.F. - Urbino, 20-22 ottobre 1994. Realizzato con i fondi M.U.R.S.T. (60%).

We have developed a programme by means of a suitable software which is able to give the values of the decrease in the microbial population better describing the sterilization degree reached also with supersaturated steam. The results obtained are encouraging in that the application of our software to the evaluation of sterilization seems to be able to validate the sterilization processes under non-standard conditions.

Parole chiave: Sterilizzazione con il calore, effetto degermante, saturazione del vapore, condizioni non standard.

Key words: Heat sterilization, evaluation of sterilization, steam saturation, non-standard condition.

Introduzione

Con il termine di sterilizzazione si indicano comunemente i metodi adoperati per il conseguimento di condizioni di sterilità, vale a dire di assenza di microrganismi viventi, anche allo stato non vegetativo.

Tra le varie metodiche che sfruttano il calore, la sterilizzazione con vapore saturo sotto pressione (in autoclave) è molto usata nell'industria farmaceutica ed in campo ospedaliero. Il calore umido, infatti, ad opportune condizioni di temperatura e di pressione è in grado di distruggere i microrganismi più rapidamente ed a temperature inferiori rispetto al calore secco, sfruttando il ruolo fondamentale del vapore di trasportatore di energia termica sul materiale da sterilizzare (1).

Le condizioni ottimali per questo tipo di sterilizzazione, indicate generalmente come condizioni standard, si raggiungono con il vapore saturo (cioè vapore acqueo in equilibrio con la fase liquida) ottenibile solo a determinate coppie di valori di temperatura e pressione (2). Nella letteratura recente si ritrovano lavori che mirano al calcolo rigoroso dei parametri impiegati per la determinazione dell'effetto degermante al variare della temperatura operativa (3), ipotizzando però di operare sempre in condizioni ottimali di saturazione con il vapore.

Nella pratica bisogna tenere in debita considerazione alcuni fattori che agiscono negativamente sul processo di sterilizzazione. Alcuni di questi possono essere controllati ed opportunamente corretti (ad es. la qualità del vapore impiegato (4)); altri, invece,

risultano legati alle condizioni del processo stesso e, come tali, comportano una deviazione dalle condizioni ottimali. Noi abbiamo indicato le situazioni che derivano come condizioni non standard, che si possono verificare ad esempio:

— nei processi di sterilizzazione di materiali infetti altamente patogeni che impediscono l'esecuzione delle necessarie operazioni di vuoto pulsante preliminari al processo di sterilizzazione vero e proprio;

— nei processi di sterilizzazione di flaconi chiusi contenenti principi attivi in soluzione, dove è presente uno spazio di testa costituito da materiale incondensabile.

Le situazioni ipotizzate non permettono di lavorare in condizioni standard in quanto l'inevitabile presenza di incondensabili causa un'alterazione dell'equilibrio dinamico condensazione-evaporazione proprio del vapore, determinando così situazioni di non saturazione.

Allo scopo di verificare quanto la presenza di aria durante il processo possa interferire sull'effetto degermante, in un precedente lavoro (5) abbiamo impostato e condotto prove sperimentali di processi di sterilizzazione in condizioni operative non standard.

I risultati ottenuti hanno confermato l'effetto negativo della non saturazione sull'esito finale del processo e ci hanno suggerito di considerare non costanti ma legati alle reali condizioni operative i parametri di comune impiego per la valutazione dell'effetto degermante (6,7) di seguito indicati:

- il parametro D, o valore di riduzione decimale, indicante in questo caso il tempo, espresso in minuti, necessario per ridurre il numero dei microrganismi ad un decimo del numero originale;
- il parametro z, indicante l'aumento di temperatura necessario per decuplicare la velocità di distruzione dei microrganismi;
- il parametro F_0 , indicante il "tempo equivalente a quello necessario a 121°C per garantire una probabilità di sopravvivenza microbica di non più di un microrganismo in 10^6 unità sottoposte a sterilizzazione" (7) e, come tale, in grado di fornire una valutazione diretta dell'effetto degermante mediante il calcolo dell'abbassamento degli esponenti di una certa carica microbica, indicato anche con F_0/D .

Il software da noi sviluppato calcola i valori D, z e T_{rif} riferibili alle condizioni non standard sulla base di opportune curve di tendenza, con l'intento di permettere la valutazione più vicina possibile al reale andamento di un processo di sterilizzazione

condotto con il vapore, in qualsiasi condizione operativa.

Descrizione del software

Aspetti teorici

Per rendere la problematica da noi avanzata di più immediata comprensione, in Tabella 1, vengono riportati i risultati sperimentali ottenuti in un nostro precedente lavoro (5) in cui avevamo condotto alcuni cicli di sterilizzazione in diverse condizioni di non saturazione con il vapore.

Tabella 1 — Condizioni sperimentali di sterilizzazione e risultati ottenuti da quattro cicli condotti in condizioni variabili (5).

	Ciclo di sterilizzazione			
	1	2	3	4
Temperatura del processo, in °C	119-121	125-126	127-129	130-131
Variatione % dalla condizione standard	2-4	15	20-25	30
Valore di F ₀ /D stimato con indicatori biologici	< 12	> 12	< 12	> 12
Valore di F ₀ /D stimato con Thermalog-S TM	4.5	19.4	10.3	18.7
Valore di F ₀ /D stimato con metodica classica	7.336	56.27	39.74	116.4

La valutazione del processo di sterilizzazione (2) si basa sull'abbassamento degli esponenti della carica microbica al tempo t calcolabile con l'equazione 1:

$$\sum_{i=0}^t \left(\frac{F_0}{D} \right)_i = \left(\frac{10^{\frac{T - T_{rif}}{z}}}{D} \right)_i \quad Eq. 1$$

In condizioni sperimentali non standard (cicli 2-4 della Tabella 1), presupponendo l'invariabilità dei valori

D, comunemente pari a 1 minuto o 1 minuto e 30 secondi circa, a seconda dei microrganismi in esame

z, comunemente pari a 10°C

T_{rif}, pari a 121°C

si otterrebbe una sovrastima dell'abbassamento degli esponenti della carica microbica.

Pertanto, affinché il parametro F₀/D risulti attendibile anche in condizioni non standard, oltre alla temperatura operativa ed alla durata del processo si deve tenere conto anche della pressione corrispondente e, di conseguenza, della variazione dalla condizione standard esprimibile mediante l'equazione 2

$$\text{Variazione \%} = \frac{P_{\text{autoclave}} - P_{\text{vapore}}}{P_{\text{autoclave}}} \cdot 100 \quad Eq. 2$$

dove P_{autoclave} è il valore della pressione all'interno dell'autoclave letto da un opportuno trasduttore di pressione, mentre P_{vapore} indica la tensione del vapore a quella temperatura (8).

Per i nostri calcoli abbiamo trasformato l'Eq. 1 in

$$\sum_{i=0}^t \left[\frac{F_0}{D \text{ (variabile)}} \right]_i = \left[\frac{10^{\frac{T - T_{rif} \text{ (variabile)}}{z \text{ (variabile)}}}}{D \text{ (variabile)}} \right]_i \quad Eq. 3$$

dove i parametri D, z e T_{rif} non sono costanti ma variano dinamicamente, in relazione alle variazioni della pressione ed al conseguente allontanamento dalle condizioni standard. Una rappresentazione grafica di tali variazioni è riportata in Fig. 1.

L'ipotesi da noi seguita per l'elaborazione delle curve di cui alla Fig. 1 è così riassumibile: un allontanamento dalle condizioni standard comporta una modifica nel meccanismo di distruzione microbica. La cinetica di degermazione conseguente può avvicinarsi a quella ottenuta mediante i processi di sterilizzazione con il calore secco.

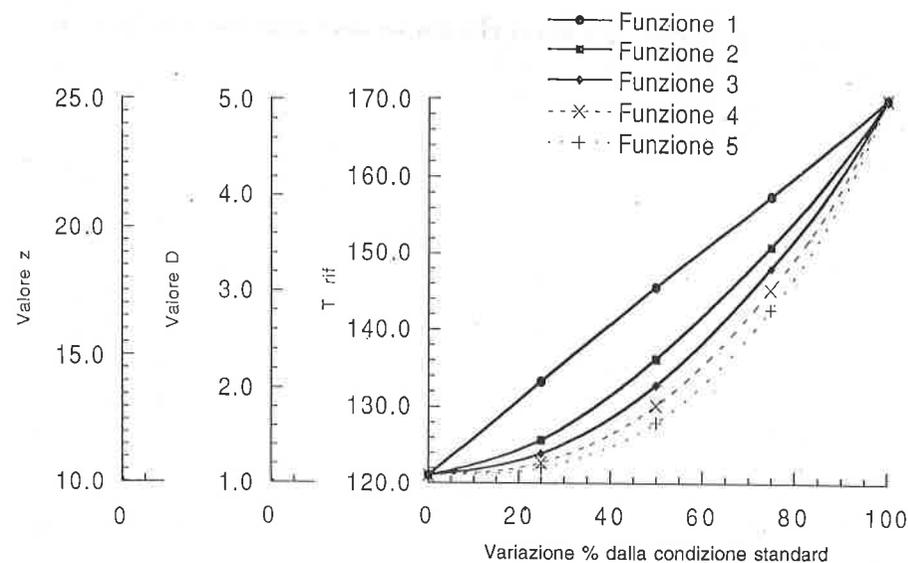


Figura 1 — Variabilità dei parametri T_{rif} , z e D in relazione all'allontanamento dalla condizione standard.

Pertanto abbiamo considerato come punti estremi le condizioni standard di vapore saturo e di calore secco. Per il primo punto abbiamo considerato i parametri tipici della sterilizzazione con vapore saturo sotto pressione (in autoclave) prima ricordati e per l'altro punto i parametri comunemente in uso per la sterilizzazione con il calore secco ($D = 5$; $z = 25$; $T_{rif} = 170^\circ\text{C}$). I due estremi così ottenuti sono stati uniti mediante curve le cui formule generali sono:

per la curva 1

$$y = b + mx$$

per le curve 2-5

$$y = b + \left(\frac{x}{a}\right)^c$$

In particolare, per le curve 2, 3, 4 e 5 i valori numerici delle costanti a e c sono stati in prima istanza ponderati e poi da noi scelti in modo da rappresentare curve esponenziali a concavità crescente.

Infatti, il grado di concavità risulta inversamente proporzionale alla correzione apportata ai vari parametri in esame, coerentemente con i risultati riportati in Tabella 2.

Tabella 2

Risultati ottenuti mediante elaborazione con il nostro software.

	Ciclo di sterilizzazione			
	1	2	3	4
Valore di F_0/D stimato mediante applicazione della funzione n.1	4.343	4.213	2.189	3.31
Valore di F_0/D stimato mediante applicazione della funzione n.2	4.753	18.51	12.61	19.66
Valore di F_0/D stimato mediante applicazione della funzione n.3	4.931	25.89	20.71	38.06
Valore di F_0/D stimato mediante applicazione della funzione n.4	5.112	31.29	28.75	56.32
Valore di F_0/D stimato mediante applicazione della funzione n.5	5.504	34.76	35.19	83.54
Valore di F_0/D stimato con Thermalog-S TM	4.5	19.4	10.3	18.7

Riteniamo opportuno, a questo punto, sottolineare che le nostre osservazioni ben si addicono per condizioni di allontanamento da quelle standard inferiori al 40%. In effetti, a livello operativo risulta altamente improbabile condurre cicli di sterilizzazione in autoclave in situazioni più drastiche. Inoltre, almeno in linea teorica, una variazione maggiore del 40% deve comportare la verifica dell'attendibilità dei risultati ottenuti con i normali indicatori in uso, sia biologici che chimico-fisici.

Aspetti pratici

Il software da noi sviluppato prevede la possibilità di selezionare:

- a) il tipo di processo, vale a dire:
1. sterilizzazione con calore umido
 2. sterilizzazione con calore secco
 3. processi di depirogenazione;
- b) il tipo di equazione da considerare per il calcolo del parametro F_0/D ;
- c) i parametri F_0/D massimo e F_0/D minimo valutati durante un ciclo di sterilizzazione.

In particolare:

il punto a) è di interesse per la possibile futura estensione del campo di applicazione del software a processi di sterilizzazione e/o di depirogenazione a calore secco;

il punto b), d'altro canto, può essere impiegato per la valutazione del parametro F_0/D di un ciclo di sterilizzazione in tempo reale ovvero per elaborazioni di dati derivanti da un processo precedentemente condotto. Tale caratteristica è molto importante: infatti consente di prendere in considerazione in qualsiasi momento i rapporti tecnici memorizzati da un sistema e, mediante uno specifico programma di simulazione, tutti quei protocolli di convalida che presentino la registrazione delle condizioni operative di processo (Temperatura; Pressione; Tempo del processo);

il punto c) è di interesse poiché il valore numerico derivante dal rapporto tra questi parametri permette di esprimere il giudizio finale (favorevole, da ottimizzare o non accettabile) da attribuire all'intero processo condotto.

Risultati e discussione

Come ricordato in precedenza, in Tabella 1 sono indicate le condizioni sperimentali di sterilizzazione ed i risultati ottenuti in un nostro precedente lavoro da quattro cicli condotti in condizioni diverse (5). Più in dettaglio, sia le temperature che le pressioni operative durante i vari cicli sono state registrate mediante un'apparecchiatura da noi precedentemente realizzata (2); per quanto riguarda il conseguimento dei risultati abbiamo impiegato:

- indicatori biologici, costituiti da *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 7953), in conformità con quanto riportato in F.U.I. IX;
- indicatori chimico-fisici di comune impiego (9, 10), in grado di risentire delle condizioni sperimentali del processo;
- metodi di conteggio dell'abbassamento degli esponenti della carica microbica operanti in base all'Eq. 1.

Si ricorda che il valore di F_0/D comunemente accettato per un giudizio favorevole di un processo di sterilizzazione in autoclave risulta pari a 12.

Dalla lettura di questi dati, nelle condizioni sperimentali adottate, si evidenzia chiaramente la netta differenza dei valori ottenuti con le varie metodiche e la non affidabilità della valutazione del parametro F_0/D ottenuto mediante l'applicazione dell'Eq. 1. Quest'ultimo aspetto avvalorava il nostro lavoro per la realizzazione di un sistema più affidabile per il conteggio di tale parametro.

Pertanto, abbiamo inserito nel software da noi proposto i dati di temperatura e di pressione di cui alla Tabella 1. Nel caso in esame, evidentemente, il software lavora in condizioni di simulazione di processo.

Le Figure 2 e 3 mostrano un certificato fornito al termine della simulazione del ciclo di sterilizzazione e le relative rielaborazioni operate mediante le funzioni già indicate in Figura 1 (i dati riportati si riferiscono al ciclo 3 della Tabella 1, poiché altamente significativo in quanto molto prossimo al limite di accettabilità di un processo di sterilizzazione).

In Tabella 2 sono schematicamente riportati i risultati ottenuti dall'elaborazione dei quattro cicli di sterilizzazione, considerando come valore più probabile quello ottenuto mediante gli indicatori chimico-fisici Thermalog-STM. Dalla lettura di questi dati si può concludere che la funzione lineare 1 della Fig. 1 "frena" in maniera eccessiva il conteggio di F_0/D , fornendo dei valori troppo bassi. Invece, nel caso delle funzioni esponenziali 2-5, quella che ha fornito risultati pressoché sovrapponibili con gli indicatori di confronto è risultata la funzione 2.

Conclusioni

Da quanto abbiamo esposto si può affermare l'utilità di disporre di un sistema in grado di fornire una corretta valutazione dell'abbassamento degli esponenti della carica microbica in condizioni di processo non standard.

I risultati ottenuti mediante il software da noi proposto si avvicinano in maniera molto soddisfacente al reale andamento di un processo di sterilizzazione. Ciò lascia ben sperare per lo studio accurato della cinetica di degermazione nei vari casi che si possono riscontrare nella pratica operativa comunemente adottata.

Macchina: _____ Tipo: _____ Modello: _____ Anno di costruzione: _____ Matricola: _____
 Ditta costruttrice: _____
 Tipo di processo esaminato: Sterilizzazione con Calore Umido - Ciclo n. 2
 Tipo di impostazione dei dati: Simulazione di processo, con valutazione dei parametri inseriti manualmente dall'operatore.

ELABORAZIONE IN BASE ALLA FUNZIONE 1

	mBar	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
10:38:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 F _{0/D}
10:39:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	0.5	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4 F _{0/D}
10:40:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	1.0	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.8	0.8	0.8	0.9	0.9 F _{0/D}
10:41:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	1.4	0.9	0.9	0.9	1.0	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	1.3	1.3 F _{0/D}
10:42:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	1.9	1.1	1.2	1.2	1.3	1.4	1.5	1.5	1.6	1.7	1.8	1.7 F _{0/D}
10:43:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	2.4	1.4	1.5	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	2.0	2.1	2.2	2.1 F _{0/D}
10:44:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	2.9	1.7	1.8	1.8	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.7	2.5 F _{0/D}
10:45:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	3.4	2.0	2.0	2.1	2.3	2.4	2.6	2.6	2.8	2.9	3.1	3.0 F _{0/D}
10:46:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	3.8	2.3	2.4	2.5	2.6	2.8	2.9	3.0	3.2	3.3	3.6	3.4 F _{0/D}
10:47:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	4.3	2.6	2.6	2.7	2.9	3.1	3.3	3.4	3.6	3.8	4.1	3.8 F _{0/D}
10:48:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	4.8	2.9	3.0	3.1	3.2	3.4	3.6	3.8	4.0	4.2	4.5	4.3 F _{0/D}
10:49:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	5.3	3.1	3.2	3.4	3.6	3.8	4.0	4.2	4.3	4.6	4.9	4.7 F _{0/D}
10:50:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	5.8	3.4	3.5	3.7	3.9	4.1	4.4	4.5	4.8	5.0	5.4	5.1 F _{0/D}
10:51:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	6.2	3.7	3.8	4.0	4.3	4.5	4.7	4.9	5.1	5.4	5.8	5.6 F _{0/D}
10:52:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	6.7	4.0	4.1	4.3	4.6	4.8	5.1	5.3	5.6	5.9	6.2	6.0 F _{0/D}
10:53:00	1765	126.1	125.0	125.1	125.2	125.3	125.4	125.5	125.6	125.7	125.8	125.9	125.8 °C
Variazione:	13.7%	7.1	4.2	4.4	4.5	4.8	5.1	5.4	5.6	5.9	6.2	6.7	6.4 F _{0/D}

Valore di $\Sigma(F_{0/D})$ minimo: 4.213 (Sonda S2)

DATA 10/10/1994

FIRMA DEL RESPONSABILE

Figura 2 — Esempio di certificato emesso al termine di un ciclo di sterilizzazione.

Macchina: _____ Tipo: _____ Modello: _____ Anno di costruzione: _____ Matricola: _____
 Ditta costruttrice: _____
 Tipo di processo esaminato: Sterilizzazione con Calore Umido - Ciclo n. 2
 Tipo di impostazione dei dati: Simulazione di processo, con valutazione di parametri impostati in precedenza; RIELABORAZIONE IN BASE ALLA FUNZIONE 2

Valore di $\Sigma(F_{0/D})$ minimo: 18.506 (Sonda S2)

DATA 10/10/1994

FIRMA DEL RESPONSABILE

Macchina: _____ Tipo: _____ Modello: _____ Anno di costruzione: _____ Matricola: _____
 Ditta costruttrice: _____
 Tipo di processo esaminato: Sterilizzazione con Calore Umido
 Tipo di impostazione dei dati: Simulazione di processo, con valutazione di parametri impostati in precedenza; RIELABORAZIONE IN BASE ALLA FUNZIONE 3

Valore di $\Sigma(F_{0/D})$ minimo: 25.878 (Sonda S2)

DATA 10/10/1994

FIRMA DEL RESPONSABILE

Macchina: _____ Tipo: _____ Modello: _____ Anno di costruzione: _____ Matricola: _____
 Ditta costruttrice: _____
 Tipo di processo esaminato: Sterilizzazione con Calore Umido - Ciclo n. 2
 Tipo di impostazione dei dati: Simulazione di processo, con valutazione di parametri impostati in precedenza; RIELABORAZIONE IN BASE ALLA FUNZIONE 4

Valore di $\Sigma(F_{0/D})$ minimo: 31.294 (Sonda S2)

DATA 10/10/1994

FIRMA DEL RESPONSABILE

Macchina: _____ Tipo: _____ Modello: _____ Anno di costruzione: _____ Matricola: _____
 Ditta costruttrice: _____
 Tipo di processo esaminato: Sterilizzazione con Calore Umido - Ciclo n. 2
 Tipo di impostazione dei dati: Simulazione di processo, con valutazione di parametri impostati in precedenza; RIELABORAZIONE IN BASE ALLA FUNZIONE 5

Valore di $\Sigma(F_{0/D})$ minimo: 34.755 (Sonda S2)

DATA 10/10/1994

FIRMA DEL RESPONSABILE

Figura 3 — Esempi di certificati relativi alla rielaborazione di dati preimpostati.

Riteniamo che il software da noi realizzato sia di facile applicabilità e possa dare un contributo essenziale in tutti quei processi di sterilizzazione non standard di interesse in campo industriale farmaceutico (ad es. lotti di dimensioni notevoli; contenitori primari chiusi con principi attivi in soluzione; operazioni di "cleaning-in-place" e di "steam-in-place", conosciute anche con le loro rispettive sigle CIP e SIP) ed ospedaliero (ad es. materiali inquinati da forme altamente patogene).

Bibliografia

- 1) *De Sain C.*: Drug, device and diagnostic manufacturing - The ultimate resource handbook, II Ed., Interpharm Press Inc., Buffalo Grove, IL, pagg. 247-251 (1993).
- 2) *Lencioni E., Franchi G.*: Nuovo approccio di convalida per i processi di sterilizzazione. *Acta Technol. Legis Med.* *III*, 49, 1992.
- 3) *Armenante P.M.*: Derivation of a rigorous equation for the calculation of the F-value in isothermal sterilization processes. *J. Pharm. Sci.* *83*, 668, 1994.
- 4) *Lencioni E., Franchi G., Corti P., Brogi V.*: Convalida del vapore da utilizzare nei processi di sterilizzazione. *Boll. Chim. Farm.* *123*, 439, 1984.
- 5) *Lencioni E., Travagli V., Lubner G.C.*: Experimental comparison tests of different systems for the validation of some parameters of standard and non-standard steam sterilization processes. *Boll. Chim. Farm.* *132*, 488, 1993.
- 6) *Pflug I.J.*: "Heat sterilization"; in *Industrial Sterilization*, Phillips G.B., Miller W.S. Eds., Duke University Press, Durham, NC, pagg. 239-82, (1973).
- 7) *F.U.I.* IX Ed.; vol. I, 432, 1985.
- 8) *Perry R.H., Green D.W.*: Perry's chemical engineers' handbook, VI Ed., Mc Graw-Hill, NY (1984).
- 9) *Franchi G., Lencioni E.*: La sicurezza di un processo di sterilizzazione a vapore in campo farmaceutico mediante l'impiego degli indicatori Thermalog-S. *Boll. Chim. Farm.* *117*, 620, 1978.
- 10) *Lena P.*: Principi della sterilizzazione a vapore. Studi comparativi tra indicatori biologici e chimici. *Boll. Chim. Farm.* *119*, 63, 1980.