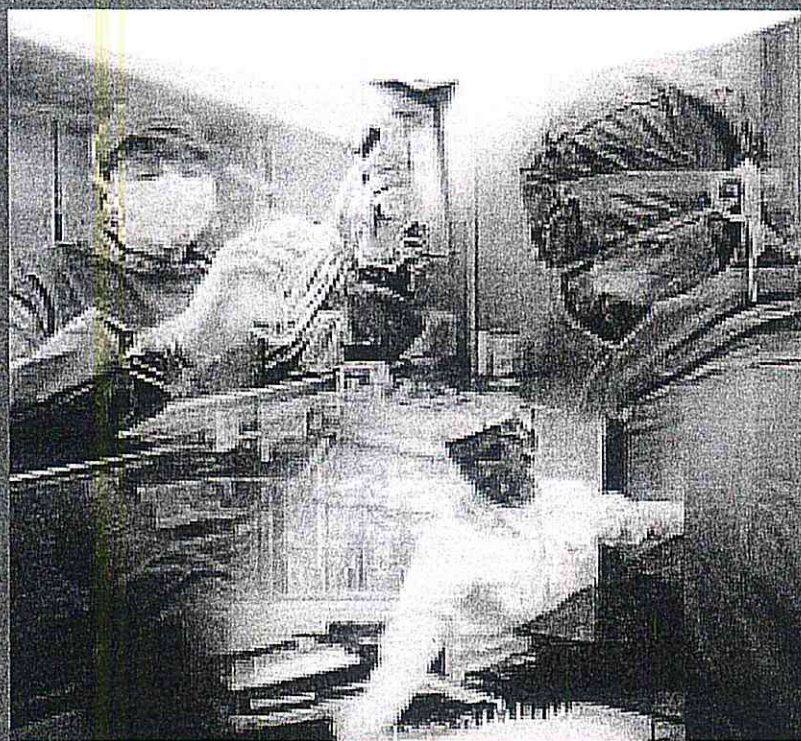


AL.CHI.MI.A.

*Rapporto di convalida efficacia
antimicrobica Sistema «Tenda Separè»
con trattamento germicida UV-C*

*Committente :
EVEREST Srl*



Qualità per le aziende

ALCHIMIA	RAPPORTO	Codice: RPI-EVE-001
		Rev. 0
Pag. 1 di 6	EFFICACIA ANTIMICROBICA DELLA TENDA SEPARÉ CON GERMICIDA UV-C DI EVEREST Srl	

Emesso da SQC: <i>Sotchiara Filipp</i>	Verificato da QA : <i>Chiara Gali</i>	Approvato da CT : <i>[Signature]</i>
---	--	---

INDICE

1	RIFERIMENTI DOCUMENTALI	2
2	REPARTI INTERESSATI	2
3	COMMITTENTE	2
4	OGGETTO	2
5	DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ	2
5.1	Materiali ed attrezzature utilizzati	2
5.2	Terreni ed eluenti utilizzati	3
5.3	Microorganismi utilizzati	3
5.4	Campioni	4
6	PROCEDIMENTO	4
6.1	Preparazione dei patch	4
6.2	Preparazione dell'inoculo microbico	4
6.3	Preparazione dei campioni da sottoporre alla prova	4
7	RISULTATI	5
8	OSSERVAZIONI	6
9	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI	6

Storia delle revisioni

Rev n°	Data di applicazione	Motivo della revisione
0	08/08/2014	Prima stesura

ALCHIMIA	RAPPORTO	Codice: RPI-EVE-001
Pag. 2 di 6	EFFICACIA ANTIMICROBICA DELLA TENDA SEPARÉ CON GERMICIDA UV-C DI EVEREST Srl	Rev. 0

1 RIFERIMENTI DOCUMENTALI

European Pharmacopeia 8th ed. 5.1.3 "Efficacy of antimicrobial preservation"

Protocollo di studio_ "Efficacia antimicrobica della tenda separé con germicida UV-C di Everest Srl" Rev.2.

Rapporto di studio_ "Verifica proprietà antimicrobiche del tessuto della tenda separé di EVEREST Srl" Rev.0.

2 REPARTI INTERESSATI

Laboratorio AL.CHI.MI.A. S.r.l.

3 COMMITTENTE

EVEREST S.r.l. – TAO Tessile

4 OGGETTO

Il presente rapporto descrive le modalità di esecuzione e i risultati della prova di determinazione dell'efficacia antimicrobica della tenda separé con lampade germicide UV-C di EVEREST S.r.l., condotta c/o i laboratori AL.CHI.MI.A S.r.l. secondo il protocollo PST rev2 concordato con il cliente.

Scopo della prova è verificare l'attività antimicrobica del sistema sui seguenti ceppi microbici: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* (enterococco Vancomicina resistente), *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

5 DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ

La prova è consistita nel contaminare artificialmente una porzione circoscritta di tenda (in seguito descritta dal termine *patch*) con un inoculo di concentrazione nota (indicativamente $\sim 10^3$ UFC/cm²) di un singolo microrganismo tra quelli indicati dal committente, nel sottoporre il patch ad un trattamento "disinfettante", costituito da tre passaggi sequenziali sulle lampade UV secondo il programma 3, nel recuperare i microrganismi dal patch e nel determinare il titolo dei microrganismi eventualmente ancora vivi.

5.1 Materiali ed attrezzature utilizzati

1. Prototipo di dimensioni ridotte della Tenda separé con lampada germicida UV-C
2. Cappa a flusso laminare verticale
3. Celle termostatiche a 30÷35°C; 20÷25°C
4. Bagnomaria;
5. Piastre di Petri monouso sterili;
6. Pipette graduate monouso sterili;
7. Anse per trapianti monouso sterili;
8. Provette monouso sterili;
9. Autoclave;
10. Bunsen;
11. Bilancia tecnica;
12. Cilindri graduati;
13. Bottiglie pirex;
14. Pompa da vuoto;
15. Sistema filtrante sterile, monouso, la porosità della membrana è di 0.45 µm ed il diametro è di 47 mm.

5.2 Terreni ed eluenti utilizzati

TRIPTONE SOY AGAR (TSA):	Tryptone	g 15,0
	Peptone di soia	g 5,0
	Sodio cloruro	g 5,0
	Agar	g 12,0

Solubilizzare 37 g di polvere in un litro di acqua distillata. Riscaldare fino a solubilizzazione completa. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15min.

SABOURAUD DEXTROSE AGAR:	Peptone	g 10,0
	Destrosio	g 40,0
	Agar	g 15,0

Solubilizzare 62 g di polvere in un litro di acqua distillata. Riscaldare fino a solubilizzazione completa. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15min.

TAMPONE FOSFATO SALINO (PBS) :	Sodio cloruro	g 5,0
	Sodio fosfato bibasico	g 3,5
	Potassio fosfato monobasico	g 1,5

Sospendere le polveri in un litro di acqua distillata fredda. Riscaldare fino a completa dissoluzione. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15min.

SOLUZIONE FISIOLÓGICA :	Sodio cloruro	g 9,0
-------------------------	---------------	-------

Solubilizzare in un litro di acqua distillata. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15min.

SOLUZIONE DI LAVAGGIO :	Sodio cloruro	g 5,0
	Sodio fosfato bibasico	g 3,5
	Potassio fosfato monobasico	g 1,5
	Peptone	g 1,0
	Tween 80	g 10,0

Solubilizzare le polveri in un litro di acqua distillata. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15min. La soluzione verrà di seguito indicata con la sigla SFPT0,1%+1%T80.

ACQUA STERILE

5.3 Microrganismi utilizzati

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Staphilococcus aureus* ATCC 6538
- *Enterococcus faecalis* (enterococco Vancomicina resistente) ATCC 51299
- *Clostridium sporogenes* ATCC
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Klebsiella pneumonie* ATCC 10031
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

ALCHIMIA	RAPPORTO	Codice: RPI-EVE-001
Pag. 4 di 6	EFFICACIA ANTIMICROBICA DELLA TENDA SEPARÉ CON GERMICIDA UV-C DI EVEREST Srl	Rev. 0

5.4 Campioni

I campioni del tessuto da sottoporre ad indagine sono costituiti da dischetti (*patch*) di forma circolare di circa 3cm di diametro, predisposti da EVEREST S.r.l. e costituiti dal medesimo tessuto che costituisce la tenda.

6 PROCEDIMENTO

I risultati delle attività preliminari previste nel protocollo PST rev2 concordato col cliente sono registrate nel precedente rapporto RPI "Verifica proprietà antimicrobiche del tessuto della tenda separé di EVEREST Srl" rev.0, cui si fa riferimento per la descrizione delle attività eseguite e dei risultati ottenuti.

6.1 Preparazione dei patch

In base a quanto emerso nelle fasi preliminari delle prove, i patch di tessuto possiedono un'attività antimicrobica intrinseca dovuta ad un trattamento di finissaggio antibatterico effettuato sul tessuto. Le attività preliminari hanno permesso di evidenziare come il lavaggio dei patch in lavavetrerie con ciclo normale, detergente specifico e acqua ultrapura per il risciacquo consenta di eliminare l'effetto inibitorio sulla crescita microbica. I patch così trattati, vengono lasciati asciugare spontaneamente sotto la cappa di microbiologia (classe ISO6), quindi imbustati singolarmente in busta per sterilizzazione e sterilizzati alle condizioni stabilite nelle fasi preliminari (i.e. a 121°C per 30').

6.2 Preparazione dell'inoculo microbico

La sospensione del microrganismo indagato viene preparata ricostituendo i pellet di microrganismo titolato secondo le istruzioni del fabbricante e determinandone il titolo.

La soluzione di inoculo ottenuta viene opportunamente diluita in soluzione fisiologica, al fine di avere soluzioni che permettano di inoculare concentrazioni di microrganismo pari a $\sim 10^3$ UFC/cm², $\sim 10^2$ UFC/cm² e $\sim 10^1$ UFC/cm².

6.3 Preparazione dei campioni da sottoporre alla prova

Su ciascun patch sterile viene distribuita in asepsi la soluzione di inoculo, al massimo volume stabilito nelle prove preliminari di bagnabilità ovvero 20µl. La prova viene eseguita in triplo per ogni concentrazione di inoculo. I campioni così preparati vengono lasciati asciugare spontaneamente all'aria sotto la cappa di microbiologia (tempo richiesto circa 10') e quindi vengono applicati in condizioni di asepsi alla superficie del dispositivo tenda separé, mantenuto all'interno di una zona a contaminazione controllata (classe ISO5/ISO6), in conformità alla procedura messa a punto nelle prove preliminari.

Il dispositivo tenda separé, mantenuto all'interno di una zona a contaminazione controllata, viene messo in funzione alla normale velocità di esercizio (5cm/sec) secondo il protocollo di disinfezione: la tenda del dispositivo separé viene movimentata selezionando il programma n°3 ed esegue n°3 cicli completi di discesa-salita consecutivi. Quindi i patch vengono rimossi in asepsi.

Ciascun patch viene quindi posto in 30ml di eluente sterile (i.e. SFPT 0,1%+ 1% T80 e solo per *C. albicans* si utilizza PBS) per 10', con agitazioni manuali della soluzione ogni 2'. La popolazione microbica eventualmente presente sul patch viene rilasciata nell'eluente e viene determinata mediante la tecnica delle membrane filtranti: la soluzione di estrazione è filtrata su un particolare dispositivo filtrante pre-condizionato con 30ml di eluente sterile, che viene a sua volta lavato con eluente e la cui membrana filtrante viene trasferita su terreno TSA, mentre solo per *C. albicans* il trasferimento è eseguito su terreno Sabouraud chloram phenicol agar, specifico per la crescita dei lieviti. Le membrane trasferite in TSA sono messe in incubazione a 32°C per 3-5 giorni, mentre quelle trasferite in Sabouraud chloram phenicol agar sono incubate a 22°C per 5-7 giorni.

ALCHIMIA	RAPPORTO	Codice: RPI-EVE-001
		Rev. 0
Pag. 5 di 6	EFFICACIA ANTIMICROBICA DELLA TENDA SEPARÉ CON GERMICIDA UV-C DI EVEREST Srl	

Il numero dei microrganismi vivi è stimato mediante conta su piastra, al termine del periodo di incubazione ed espresso come Unità Formanti Colonie (UFC) sviluppate/cm².

7 RISULTATI

I dati grezzi degli esperimenti condotti sono stati registrati nel quaderno di laboratorio.

Nelle seguenti tabelle 1, 2 e 3, distinte per specie microbiche, sono riassunti i risultati ottenuti, ovvero le cariche microbiche delle sospensioni test rilevate prima e dopo il trattamento disinfettante, l'abbattimento logaritmico e l'abbattimento percentuale per ciascun microrganismo alla concentrazione test di ~10³UFC/cm².

I dati riportati sono la media delle tre replicazioni eseguite.

Tabella 1_Lieviti

MICRORGANISMO	Z	Popolazione microbica 10 ³ /cm ²			
		t0	DOPO 3 PASSAGGI UV	ABBATTIMENTO LOG	ABBATTIMENTO %
CANDIDA ALBICANS ATCC 10231	3,5	5.043	75	2	99%

Tabella 2_Batteri Gram +

MICRORGANISMO	Z	Popolazione microbica 10 ³ /cm ²			
		t0	DOPO 3 PASSAGGI UV	ABBATTIMENTO LOG	ABBATTIMENTO %
STAFILOCOCCO AUREO ATCC 6538	11	38.000	900	2	99%
ENTEROCOCCO FECALIS ATCC 51299	11	29.170	312	2	99%
CLOSTRIDIUM SPOROGENES ATCC 16404	11	175.170	1.885	2	99%

Tabella 3_Batteri Gram -

MICRORGANISMO	Z	Popolazione microbica 10 ³ /cm ²			
		t0	DOPO 3 PASSAGGI UV	ABBATTIMENTO LOG	ABBATTIMENTO %
ESCHERICHIA COLI ATCC 8739	30	12.150	490	2	99%
KLEBSIELLA PNEUMONIAE ATCC 10031	30	58.000	100	2	99%
PSEUDOMONAS AERUGUNOSA ATCC 9027	30	473.200	1.624	2	99%

ALCHIMIA	RAPPORTO	Codice: RPI-EVE-001
Pag. 6 di 6	EFFICACIA ANTIMICROBICA DELLA TENDA SEPARÉ CON GERMICIDA UV-C DI EVEREST Srl	Rev. 0

8 OSSERVAZIONI

Le attività di indagine preliminare, eseguite al fine di ottimizzare il fattore di recupero Z dei ceppi microbici, con la sola eccezione della *Candida albicans*, non hanno portato ai risultati sperati ovvero ad un valore di $Z \leq 4$. In fase di analisi si è ripetuta la stima del valore di Z per i microrganismi sottoposti a test, giungendo a un valore ottimale di $Z=11$ per i batteri Gram+ e di $Z=30$ per i batteri Gram-.

Per questa ragione, i risultati delle attività eseguite su popolazioni microbiche dell'ordine di $\sim 10^2$ UFC/cm² e $\sim 10^1$ UFC/cm² non sono state riportate nel presente Rapporto, poiché la contaminazione risulta essere troppo esigua per fornire dati di effettiva efficacia di abbattimento.

9 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Le attività di eseguite c/o il Laboratorio di AL.CHI.MI.A S.r.l. permettono di affermare che il dispositivo tenda separé con lampada germicida UV-C di EVEREST S.r.l. presenta attività antimicrobica, dimostrando un abbattimento del titolo della sospensione test dei microrganismi esaminati del 99% della contaminazione indotta, pari a una riduzione di $2\log$ della popolazione microbica.

I dati ottenuti sono conformi ai criteri di accettazione e agli obiettivi indicati dal cliente.