

ALCHIMIA	PROTOCOLLO	Codice: PST
		Rev. 1
Pag. 1 di 5	EFFICACIA ANTIMICROBICA DELLA TENDA SEPARÉ CON GERMICIDA UV-C DI EVEREST Srl	

INDICE

1	RIFERIMENTI DOCUMENTALI.....	2
2	REPARTI INTERESSATI	2
3	SCOPO	2
4	DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ.....	2
4.1	Materiali ed attrezzatura necessari.....	2
4.2	Terreni ed eluenti utilizzati	3
4.3	Microrganismi utilizzati	3
4.4	Campioni	3
5	PROCEDIMENTO.....	3
5.1	Attività preliminari	3
5.2	Descrizione delle fasi di analisi.....	4
5.3	Espressione dei risultati.....	4
6	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI	5
6.1	Criteri di accettazione definiti dal cliente	5

Storia delle revisioni

Rev n°	Data di applicazione	Motivo della revisione
0	17/03/2014	Prima stesura
1	07/04/2014	Al paragrafo 6, inserimento dei criteri di accettazione da parte del cliente

ALCHIMIA	PROTOCOLLO	Codice: PST
Pag. 2 di 5	EFFICACIA ANTIMICROBICA DELLA TENDA SEPARÉ CON GERMICIDA UV-C DI EVEREST Srl	Rev. 1

1 RIFERIMENTI DOCUMENTALI

European Pharmacopeia 7th ed. 5.1.3

2 REPARTI INTERESSATI

Reparto Controllo Qualità c/o AL.CHI.MI.A. S.r.l.

3 SCOPO

Il presente protocollo descrive le modalità di messa a punto ed esecuzione della prova di determinazione dell'efficacia antimicrobica della tenda separé a rullo con germicida UV-C fornita da EVEREST S.r.l. Il dispositivo è costituito da una tenda a rullo in filato poliestere, sul cui cassonetto sono montate delle lampade UV che permettono l'abbattimento della carica microbica avvolgendo o svolgendo la tenda.

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

4 DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ

L'analisi consiste nel contaminare artificialmente una porzione circoscritta di tenda (patch) con un inoculo di concentrazione nota (indicativamente $\sim 10^8$ UFC/cm²) di un singolo microrganismo tra quelli indicati dal committente, nel sottoporre il patch ad un passaggio sulle lampade UV, nel recuperare i microrganismi eventualmente presenti dal patch e di determinare il titolo dei microrganismi vivi.

4.1 Materiali ed attrezzatura necessari

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.

ALCHIMIA	PROTOCOLLO	Codice: PST
Pag. 3 di 5	EFFICACIA ANTIMICROBICA DELLA TENDA SEPARÉ CON GERMICIDA UV-C DI EVEREST Srl	Rev. 1

4.2 Terreni ed eluenti utilizzati

- TRIPTONE SOY AGAR (TSA)
- SABOURAUD CHLORAM PHENICOL
- TAMPONE FOSFATO SALINO
- SOLUZIONE FISIOLÓGICA
- SOLUZIONE DI LAVAGGIO
- ACQUA STERILE

4.3 Microrganismi utilizzati

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

4.4 Campioni

I campioni del tessuto da sottoporre ad indagine sono costituiti da dischetti (i.e. patch) di forma circolare di circa 3cm di diametro, predisposti da EVEREST S.r.l.

5 PROCEDIMENTO

5.1 Attività preliminari

Le attività preliminari allo studio, necessarie al fine di effettuare un'adeguata stima dell'abbattimento della carica microbica attraverso l'impiego del dispositivo, sono:

1. *Verifica del massimo volume richiesto per la bagnabilità del patch:* poiché il materiale che costituisce la tenda (i.e. filato in poliestere-polietilene tereftalato) risulta molto idrofobico, è necessario definire il massimo volume di soluzione acquosa, ovvero di sospensione microbica, che può essere assorbito dal materiale a temperatura ambiente in un tempo di alcuni minuti, al fine di garantire la contaminazione con un inoculo di concentrazione $\sim 10^8$ UFC/cm².
2. *Messa a punto del processo di sterilizzazione del patch:* prima della contaminazione con l'inoculo microbico, i patch dovranno essere sterili. Poiché il materiale fonde a T \sim 300°C, si ipotizza una sterilizzazione a calore umido 121°C per 30 minuti.
3. *Verifica del recupero del microrganismo:* in questa fase si valuta quanto del microrganismo inoculato sul supporto fisico (patch) può essere recuperato per lavaggio con opportuno eluente al fine di valutare correttamente l'effetto antimicrobico dovuto all'esposizione del tessuto alle lampade UV. Si definiscono in questa fase anche le soluzioni e gli eluenti che garantiscono la miglior efficienza di recupero.
4. *Verifica di ancoraggio al dispositivo:* i patch contaminati verranno applicati alla tenda separé e in questa fase si vuole stabilire quale sia la migliore procedura di attacco, ovvero quali materiali (es. colla, biscotch, sistemi metallici, ecc.) e quali modalità garantiscano la totale aderenza del patch alla tenda durante tutte le fasi di movimentazione.

ALCHIMIA	PROTOCOLLO	Codice: PST
Pag. 4 di 5	EFFICACIA ANTIMICROBICA DELLA TENDA SEPARÉ CON GERMICIDA UV-C DI EVEREST Srl	Rev. 1

5.2 Descrizione delle fasi di analisi

Lo studio dell'efficacia antimicrobica del dispositivo prevede le seguenti attività:

1. Preparazione del campione: i patch di tessuto saranno imbustati in busta per sterilizzazione e sterilizzati alle condizioni stabilite nelle fasi preliminari.
2. Preparazione dell'inoculo: si prepara la sospensione del microrganismo indagato, ricostituendo i pellet di microrganismo titolato secondo le istruzioni del fabbricante e determinandone il titolo. La determinazione della carica microbica dell'inoculo al tempo zero ha lo scopo di determinare quanti microrganismi vivi sono effettivamente inoculati in ogni campione in esame.
La soluzione di inoculo ottenuta verrà opportunamente diluita, al fine di avere soluzioni che permettano di inoculare concentrazioni di microrganismo pari a $\sim 10^8$ UFC/cm², $\sim 10^7$ UFC/cm² e $\sim 10^6$ UFC/cm².
3. Inoculo dei campioni: su ciascun patch sterile verrà distribuita in asepsi la soluzione di inoculo, al massimo volume stabilito nelle prove preliminari di bagnabilità. Si prevede di effettuare la prova in triplo per ogni concentrazione di inoculo. I campioni così preparati verranno lasciati asciugare all'aria e quindi 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.
4. Il dispositivo, mantenuto all'interno di una zona a contaminazione controllata, verrà messo in funzione alla normale velocità di esercizio (5cm/sec) e quindi i patch verranno rimossi in asepsi.
5. Ciascun patch verrà posto in un congruo volume di eluente sterile per il tempo definito nella fase preliminare (i.e. verifica del recupero del microrganismo); quindi si determinerà l'eventuale residuo microbico mediante la tecnica delle membrane filtranti: la soluzione di estrazione verrà filtrata su un particolare dispositivo filtrante, che verrà quindi lavato con eluente e la cui membrana filtrante verrà trasferita su terreno TSA (solo per *C. albicans* il trasferimento sarà su terreno Sabouraud chloram phenicol agar). Per la sola concentrazione 10^8 UFC/cm² si effettuerà anche una diluizione 1:10 della soluzione di estrazione, che verrà filtrata separatamente, al fine di permettere una conta più accurata delle unità formanti colonia (UFC) che si dovessero sviluppare.
6. Incubazione a temperatura/e stabilita/e: le membrane trasferite in TSA verranno messe in incubazione a 32°C per 3-5 giorni, mentre quelle trasferite in Sabouraud chloram phenicol agar verranno incubate a 22°C per 5-7 giorni.
7. Conta dei microrganismi sviluppati ed espressione come Unità Formanti Colonie (UFC) sviluppate: il numero dei microrganismi vivi verrà determinato mediante conta su piastra, al termine del periodo di incubazione.

5.3 Espressione dei risultati

I risultati sono espressi come riduzione logaritmica e percentuale (%) del numero di microrganismi vivi rispetto al valore ottenuto per l'inoculo al tempo zero.

I criteri per la valutazione dell'attività antimicrobica sono espressi come riduzione logaritmica del numero di microrganismi vivi rispetto al valore ottenuto per l'inoculo al tempo zero.

ALCHIMIA	PROTOCOLLO	Codice: PST
Pag. 5 di 5	EFFICACIA ANTIMICROBICA DELLA TENDA SEPARÉ CON GERMICIDA UV-C DI EVEREST Srl	Rev. 1

6 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il dispositivo tenda separé con lampada germicida UV-C di EVEREST S.r.l. presenta attività antimicrobica se dimostra un abbattimento del titolo della sospensione test di microrganismo di almeno:

- 90% della contaminazione indotta, riduzione logaritmica pari a 1.
- 99% della contaminazione indotta, riduzione logaritmica pari a 2.
- 99,9% della contaminazione indotta, riduzione logaritmica pari a 3.

6.1 Criteri di accettazione definiti dal cliente

Gli obiettivi attesi dalla prova sono di una riduzione della carica batterica del 99 / 99,9 %.

ALCHIMIA

Laboratori di Ricerca
MURST n. 41 – G.U. n. 184 del 08/08/2000

Ponte S. Nicolò, li 24 febbraio 2014

Prot.n. 240214/OFF/SQC/2014

Spettabile
EVEREST S.R.L.
Via ROMA, 98
31050 – MIANE (TV)

Alla cortese attenzione:

Sig. Diego Antoniazzi


**OGGETTO:
OFFERTA PER LA VERIFICA DELL'EFFETTO BATTERICIDA DEL VOSTRO SISTEMA DI
IRRAGGIAMENTO UV SU TENDAGGI**

Egregio Signor Antoniazzi,

a seguito della Vostra gentile richiesta di offerta, relativa alla verifica dell'effetto battericida del vostro sistema di irraggiamento UV applicato ai vostri tendaggi, ci preghiamo di inviarVi in allegato la nostra migliore offerta per i servizi di Vostro interesse.

Rimaniamo a disposizione per qualsiasi chiarimento o quesito e, in attesa di un Vostro gentile riscontro, porgiamo

Distinti Saluti.


Enrico Bettini

resp. Consulenze Tecniche

ALCHIMIA

Laboratori di Ricerca
MURST n. 41 – G.U. n. 184 del 08/08/2000

VALUTAZIONE PRELIMINARE : APPLICAZIONE LUCE UV PER DISINFEZIONE SUPERFICIALE DI TENDAGGI

Tipo di lampada impiegata: PHILIPS da 55W ad emissione radiazioni UV-C pari a 17,5 W, lunghezza 90 cm - impiego di 2 lampade per superficie da irradiare.

Tempo di contatto: 4 sec

Superficie da irradiare: 180 cm con 2 lampade

Velocità di spostamento : esposizione di 20 cm di tenda in 4 secondi = 3600 cm²

DOSE PRODOTTA = I x T = 35000 x 4 / 3600 = 38,88 mJ/cm²

1 DOSE = 1mJ/cm²=1000 micro Watt secondo/cm²

La valutazione teorica preliminare indica che il sistema predisposto sarebbe in grado di erogare una dose di 38 mJ/cm² che comporterebbe una efficienza di abbattimento microbico del 99 % partendo da una contaminazione iniziale di 1000 ufc (unità formate colonia batterica) e lasciando una contaminazione residua di 10 ufc.

La tabella 1 riporta l'efficacia di decontaminazione della luce UV in relazione ad un microrganismo target : Escherichia coli (indicatore patogeno trasportato in acqua) la cui sensibilità è stimata in DOSE = 5.4 mJ/cm²

Dose mJ/cm ²	Riduzione nel numero di organismi viventi
5.4	90.0%
10.8	99.0%
21.6	99.9%
43.2	99.99%
86.4	99.999%

In relazione a quanto sopra esposto le esponiamo la seguente offerta di servizi di laboratorio

ALCHIMIA

Laboratori di Ricerca
MURST n. 41 - G.U. n. 184 del 08/08/2000

Offerta Servizi di Laboratorio

VERIFICA DELL'EFFETTO BATTERICIDA DELLA LUCE UV IN MICRORGANISMI TARGET

La tabella 2 riporta i microrganismi target che siamo attualmente in grado di testare presso i nostri laboratori; tale lista non è esaustiva e può essere implementata in caso di particolari necessità del cliente.

Specie
<i>Bacillus subtilis</i> (spore)
<i>Clostridium sporogenes</i>
<i>Aspergillus niger</i> (spore)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Stafilococco epidermidis</i>
<i>Stafilococco aureus</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Candida albicans</i>

L'attività prevede la stesura di un protocollo di studio condiviso con il cliente che ha lo scopo di verificare l'efficacia del trattamento UV, prodotto dall'apparecchiatura del cliente sulla superficie di tendaggi, su inoculi certificati di microrganismi target.

Le fasi di lavoro sono:

1. Predisposizione del protocollo di studio
2. Acquisizione dei microrganismi target a titolo noto (10^3 ufc/ inoculo)
3. Sviluppo e crescita dell'inoculo
4. Controllo con conteggio dell'inoculo
5. Inoculazione del materiale
6. Trattamento alla luce UV secondo lo schema predisposto dall'azienda.
7. Sviluppo della contaminazione residua con tecniche colturali microbiologiche adeguate.
8. Redazione del rapporto finale di studio.

L'obiettivo finale dello studio è quello di documentare evidenze di efficacia decontaminante del trattamento UV nell'intervallo da 90% a 99,9% per ogni singolo microrganismo testato.

ALCHIMIA

Laboratori di Ricerca
MURST n. 41 – G.U. n. 184 del 08/08/2000

Modalità di attuazione dell'incarico

Tempistica d'intervento:

le fasi 1 e 2 vengono attivate immediatamente al ricevimento dell'accettazione.

Tempi di consegna e/o risposta:

Analisi microbiologiche:

4 settimane dal momento in cui sono disponibili i microrganismi test.

I risultati analitici verranno comunque anticipati via telefonica o a mezzo fax.

Costi di Trasferta e campionamento

Trasferta: 0,67 € / km

Campionamento: 45 €/h : tecnico specializzato

Costi globali di intervento.

Verifica dell'effetto Battericida della Luce Uv per Microrganismo Target : € 1430,00

Da definire in fase di accettazione offerta il numero e la tipologia di microrganismi da testare.

Termini di pagamento.

- Pagamento anticipato pari al 25 % dell'importo totale della commessa dopo accettazione dell'offerta.
- Fatturazione del rimanente 75% ,in base alle analisi eseguite in conformità al prospetto precedentemente indicato, con pagamento mediante RIBA 30 gg d.f.f.m.

Validità dell'offerta: 2 mesi dalla data della presente.

Servizi gratuiti: - Consulenza telefonica e via fax.

I prezzi indicati nella proposta devono ritenersi al netto di I.V.A. (22%).