
*Linea guida italiana sugli aspetti
microbiologici delle acque utilizzate
nell'industria dei dispositivi medici*

Su mandato del



Ministero della Salute



Istituto Superiore di Sanità

Gennaio 2015

SOMMARIO

PREMESSA.....	3
INTRODUZIONE METODOLOGICA	4
IL RUOLO DELL'ACQUA NEI PROCESSI PRODUTTIVI.....	9
Problematiche negli impianti industriali: i biofilm.....	9
IL TRATTAMENTO DELLE ACQUE NELLA PRODUZIONE DEI DISPOSITIVI MEDICI.....	10
I CRITERI DELLA FARMACOPEA	10
DAI RISULTATI DEL PROGETTO SPERIMENTALE ALLE RACCOMANDAZIONI	12
LE RACCOMANDAZIONI.....	13
Raccomandazione 1 - La Farmacopea	14
Raccomandazione 2 - Acque “di partenza”	17
Raccomandazione 3 - Campionamento.....	18
Raccomandazione 4 - Campionamento.....	20
Raccomandazione 5 - Campionamento.....	21
Raccomandazione 6 - <i>Pseudomonas spp.</i>	22
Raccomandazione 7 - <i>Staphylococcus spp.</i>	24
Raccomandazione 8 - Enterococchi intestinali	26
Raccomandazione 9 - <i>Escherichia coli</i>	28
Raccomandazione 10 - <i>Salmonella spp.</i>	30
Raccomandazione 11 - Controllo e monitoraggio	31
Raccomandazione 12 - Sanificazione	32
BIBLIOGRAFIA	33
GLOSSARIO	37
Allegato 1	38

PREMESSA

L'acqua è utilizzata nelle officine di realizzazione dei dispositivi medici, come solvente, come diluente, per ricostituire i prodotti, durante le sintesi, come ingrediente delle preparazioni e come agente pulente delle apparecchiature, dei circuiti di distribuzione, del confezionamento primario, per la creazione di vapore, ecc. Poiché la sua qualità può influire sulla produzione e sulla sicurezza dei prodotti finiti, è necessario che l'acqua abbia specifiche caratteristiche microbiologiche.

L'accordo di collaborazione, tra Istituto Superiore di Sanità e Ministero della Salute, è nato nel 2012 dalla necessità di approfondire le conoscenze sulla qualità microbiologica delle acque utilizzate nei processi di fabbricazione dei dispositivi medici.

Lo studio è stato dedicato alla valutazione della qualità microbiologica delle acque industriali utilizzate nei processi di fabbricazione di varie tipologie di dispositivi medici prodotti in Italia, in assenza di specifiche linee guida.

Per gli aspetti microbiologici dell'acqua utilizzata nella produzione dei dispositivi medici, infatti, non sono ancora state emanate delle linee guida dedicate, ma vengono mutate quelle già applicate al settore farmaceutico che, per molti aspetti, risulta sovrapponibile a quello dei dispositivi medici.

Di conseguenza, la caratterizzazione microbiologica delle acque, utilizzate nelle varie fasi della produzione industriale, ha riguardato i parametri già previsti dalla Farmacopea e altri microrganismi patogeni, oltre agli indicatori di inquinamento fecale.

Gli scopi del progetto da cui deriva questa linea guida sono stati:

- Raccogliere dati sulla tipologia, utilizzo e controllo dei sistemi di trattamento dell'acqua di processo predisposti dalle aziende del settore dei dispositivi medici.
- Raccogliere dati sull'incidenza dell'eventuale formazione di biofilm nei sistemi di trattamento dell'acqua.
- Valutare l'uso degli indicatori microbiologici già comunemente utilizzati.

La raccolta dei dati è stata effettuata sul territorio nazionale con la collaborazione di 16 aziende del settore, produttrici di differenti tipologie di dispositivi medici, per le quali la qualità dell'acqua svolgeva un ruolo fondamentale per garantire la "bontà" del prodotto finito e la conformità ai requisiti previsti dalle norme di settore.

I destinatari delle raccomandazioni contenute in questo documento sono gli operatori del settore, tra i quali le aziende produttrici di dispositivi medici, ma anche i laboratori di analisi, i progettisti degli impianti, i consulenti e non ultimi gli enti di controllo.

INTRODUZIONE METODOLOGICA

La presente linea guida è stata redatta tenendo conto di quanto riportato nel Manuale Metodologico “Come produrre, diffondere e aggiornare linee guida per la salute pubblica” (Sistema nazionale per le linee guida-SNLG, 2011).

Percorso di elaborazione della linea guida

- ✓ Costituzione del gruppo di lavoro e identificazione dei punti chiave/obiettivi
- ✓ Ricerche di letteratura
- ✓ Evidenze sperimentali originali
- ✓ Criteri di selezione e strumenti per la valutazione metodologica
- ✓ Elaborazione del testo preliminare
- ✓ Revisione esterna
- ✓ Elaborazione del testo definitivo
- ✓ Condivisione con la società scientifica

Obiettivi e definizione del target

L'obiettivo principale dell'elaborato "*Linea guida italiana sugli aspetti microbiologici delle acque utilizzate nell'industria dei dispositivi medici*" è quello di fornire elementi di guida per i “portatori di interesse” circa la messa a punto di protocolli operativi al fine di monitorare la filiera di processo, volti alla riduzione delle criticità legate all'utilizzo dell'acqua.

Gli argomenti sono derivati dall'analisi della letteratura scientifica e dalla esperienza acquisita durante lo studio. Tuttavia non sono state tralasciate le conoscenze e le indicazioni derivanti da norme o linee guida nate per altri settori, ma correntemente applicati anche per i dispositivi medici, come per esempio la Farmacopea.

Forza delle raccomandazioni e livello delle evidenze

Le raccomandazioni espresse in questa linea guida sono basate sui risultati delle **5040** analisi, eseguite sui 240 campioni di acqua prelevati in 5 siti, in ciascuna delle 16 aziende produttrici di dispositivi medici in cui l'acqua ha un ruolo importante nel processo produttivo.

Come indicato nel *Piano Nazionale Linee Guida*, le raccomandazioni sono espresse dalla **Forza della Raccomandazione** e dal **Livello di Prova**, indicati rispettivamente con lettere (A-E) e numeri romani (I-IV).

Con Forza della Raccomandazione ci si riferisce alla probabilità che l'applicazione nella pratica di una raccomandazione determini un miglioramento dello stato di salute della popolazione e quindi nello specifico della qualità e sicurezza del dispositivo medico.

- A** *Indica una forte raccomandazione a favore dell'esecuzione di quella particolare procedura, sostenuta da prove scientifiche di buona qualità, anche se non necessariamente di tipo I o II*
- B** *Si nutrono dei dubbi sul fatto che quella particolare procedura o intervento debba sempre essere raccomandata, ma si ritiene che la sua esecuzione debba essere attentamente considerata*
- C** *Esiste una sostanziale incertezza a favore o contro la raccomandazione di eseguire la procedura o l'intervento*
- D** *L'esecuzione della procedura non è raccomandata*
- E** *Si sconsiglia fortemente l'esecuzione della procedura*

Con Livello di Prova ci si riferisce alla probabilità che le conoscenze siano derivate da studi pianificati e condotti in modo tale da produrre informazioni valide e prive di errori sistematici.

- I** *Prove ottenute da analisi microbiologiche della totalità dei campioni eseguite in replicato (tre repliche) con controlli positivi e negativi*
- II** *Prove ottenute da analisi microbiologiche della totalità dei campioni eseguite in replicato (due repliche) con controlli positivi e negativi*
- III** *Prove ottenute dall'analisi dei risultati e/o dalla pratica comune adottata e/o dalla buona pratica di laboratorio*
- IV** *Prove basate su Linee Guida internazionali o sull'opinione di esperti autorevoli o di comitati di esperti, consensus conference, o basate su opinioni dei membri del gruppo di lavoro responsabile di queste linee guida*

Il gruppo di lavoro

Per loro natura le raccomandazioni raccolte in una linea guida sono affermazioni operative, pertanto devono essere basate sulle migliori conoscenze disponibili, chiare, non passibili di interpretazioni divergenti, sintetiche ed applicabili nel contesto operativo individuato. La realtà è complessa e per questo all'interno di raccomandazioni apparentemente semplici è necessario raccogliere l'accordo di professionalità e interessi diversi. Per questa ragione la multidisciplinarietà e la rappresentatività dei gruppi coinvolti nell'elaborazione e nella revisione di questo testo sono stati un aspetto importante.

Per salvaguardare il valore scientifico del documento e il suo legame costitutivo con il contesto di applicazione, precedenti esperienze (Faggiano *et al.*, 2007), suggeriscono di definire ambiti concentrici di competenza, nei quali identificare i soggetti più rispondenti alle esigenze di quel particolare ambito.

A tal fine il gruppo di lavoro, che ha avuto la responsabilità della conduzione dei lavori, è composto da tre strutture concentriche: un gruppo di coordinamento, un panel di esperti e un gruppo di consultazione allargato (Fig. 1).



Figura 1. Rappresentazione del gruppo di lavoro (da Faggiano, 2007 modif.)

Il gruppo di lavoro di questo progetto ha visto impegnati per 24 mesi personale dell'Istituto Superiore di Sanità, in particolare del Reparto Qualità Ambientale e Ittiocoltura, afferente al dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria (AMPP_QAI), e del centro Organismo Notificato per i Dispositivi medici e per la valutazione dei Cosmetici (ONDICO) e personale appartenente a strutture esterne sia pubbliche che private.

I compiti sono stati così suddivisi:

Gruppo di coordinamento

Il **gruppo di coordinamento**, formato da personale dell'Istituto e guidato dal Responsabile scientifico del progetto, ha avuto la responsabilità della conduzione dello studio ed ha coordinato tutto lo svolgimento dei lavori.

- Laura MANCINI, responsabile scientifico e coordinatore (AMPP_QAI)
- Cristina ROMANELLI (ONDICO)
- Stefania MARCHEGGIANI (AMPP_QAI)
- Cinzia GRASSO (AMPP_QAI)

Panel di esperti

Il **panel di esperti**, che include tutti i tecnici competenti degli argomenti trattati dalla linea guida ed esperti di settore interni all'Istituto Superiore di Sanità, ha gestito le attività correlate allo studio, cioè ha eseguito le analisi, ha raccolto, organizzato e analizzato i dati e tutte le evidenze scientifiche, ha elaborato insieme al gruppo di coordinamento i quesiti ed ha coordinato la consultazione del gruppo allargato.

- Loredana MUSMECI, Direttore del Dipartimento AMPP
- Carmine GUARINO, Direttore del Centro ONDICO

AMPP_QAI

- Anna Maria D'ANGELO
- Elio PIERDOMINICI
- Silvana CACIOLLI
- Camilla PUCCINELLI
- Roberto GIUSEPPETTI
- Emilio D'UGO
- Filippo CHIUDIONI
- Massimiliano BUGARINI
- Elisabetta VOLPI
- Fabrizio VOLPI
- Mario FIGLIOMENI

MINISTERO DELLA SALUTE

- Maria Rosaria Lombardi
- Giuseppina Terzulli
- Graziella Quinci

Gruppo di consultazione allargato

Il **gruppo di consultazione allargato**, costituito dalle aziende e dalle strutture private che hanno collaborato con il progetto, ha rappresentato gli interessi e i punti di vista sia degli operatori del settore sia della popolazione intesa come utilizzatore del dispositivo medico. Le aziende e le altre strutture private sono state coinvolte già dal principio dei lavori e sono state mantenute costantemente aggiornate sullo svolgimento delle analisi e sui dati riscontrati, sempre nel rispetto della riservatezza dei dati trattati. Importante nella condivisione dei dati sono stati gli incontri tecnici, le giornate di studio e i convegni.

Dichiarazione dei conflitti d'interesse

Tutti i componenti del gruppo di lavoro hanno dichiarato che non esiste conflitto di interessi con le aziende coinvolte nella produzione di dispositivi medici. Le singole aziende hanno lavorato ciascuna separatamente protette da codici identificativi.

Metodologia del processo di consenso

Il gruppo di lavoro ha elaborato il documento attraverso la verifica progressiva dei contenuti, tramite riunioni di aggiornamento e contatti via e-mail. Si sono raccolti i consensi ed i pareri, del gruppo di consultazione allargato, anche attraverso la compilazione di Questionari ed incontri mirati. L'ultima fase di aggiornamento ha previsto la condivisione dei dati anonimi e delle idee emerse in una seduta comune nell'ambito di un convegno nazionale tenuto presso l'Istituto Superiore di Sanità. Questa ultima fase ha concluso il processo, cui sono seguite l'aggregazione dei pareri e la stesura dei documenti finali (Murphy, 1998).

Aggiornamento

È previsto un aggiornamento della linea guida, anche periodico, basato sull'incremento delle conoscenze nel settore, sulla base del contributo di esperti o nel momento in cui cambi la base dell'evidenza, tanto da rendere obsoleti le raccomandazioni o il loro aggiornamento.

IL RUOLO DELL'ACQUA NEI PROCESSI PRODUTTIVI

“L'acqua è una risorsa vitale per la salute umana ed un fattore di produzione essenziale per l'agricoltura, il turismo, l'industria, i trasporti e l'energia. Una minore disponibilità di acqua comporta conseguenze gravi per l'energia idraulica e il raffreddamento delle centrali termiche e nucleari. Il buono stato ambientale e la salute dei cittadini dipendono dalla qualità e dalla disponibilità delle acque dolci [...]” (Dworak *et al.*,2007; EU, 2011; ANPA, 2011).

Problematiche negli impianti industriali: i biofilm

Il biofilm è un aggregato di cellule microbiche, incluse in una matrice polimerica extracellulare, capaci di crescere su una superficie (Flemming *et al.*,2010).

I meccanismi molecolari che regolano le distinte fasi di formazione e sviluppo del biofilm, variano notevolmente tra le diverse specie batteriche e dipendono dalle condizioni ambientali caratteristiche di ogni specie. Tuttavia, i biofilm hanno una caratteristica comune, la matrice, costituita da sostanze polimeriche extracellulari (EPS), composta principalmente da esopolisaccaridi, proteine e acidi nucleici (Costerton *et al.*,1995; Branda *et al.*,2005; Hoiby *et al.*,2010).

Le cellule integrate in un biofilm, differiscono notevolmente dalle rispettive forme planctoniche e mostrano proprietà nuove e specifiche, come un'augmentata resistenza ai trattamenti con biocidi (Sutherland, 2001; Donlan and Costerton, 2002; Smith and Hunter, 2008).

Il biofilm è uno degli aspetti gestionali prioritario degli impianti industriali di stoccaggio e di distribuzione dell'acqua (Demadis *et al.*,2007), poiché si forma sulle superfici a contatto con acqua come le tubazioni, in particolare in corrispondenza di tratti della rete dove è ridotta la velocità di flusso dell'acqua (diramazioni, curve, raccordi, valvole) o dove si stabiliscono condizioni di potenziale ristagno (rubinetti, soffioni, guarnizioni e raccordi).

In condizioni di dinamicità del sistema, i biofilm si distaccano dal substrato e, trasportati dall'acqua, si spostano nei circuiti e sono capaci di colonizzare nuove zone. I principali fattori che ne determinano la ricrescita sono la temperatura, la disponibilità di nutrienti e la mancanza di disinfezione residua (Volk and Le Chevallier, 1999; Hamanaka *et al.*,2012; Zrelli *et al.*,2013).

Oltre a compromettere la qualità dell'acqua, i biofilm che si sviluppano nelle condutture degli impianti industriali possono rallentare il flusso dei fluidi e compromettere il ciclo di produzione (Javaherdashti, 2008).

Biofilm anche molto sottili, possono causare una diminuzione dei livelli di ossigeno, creando condizioni di anossia che possono favorire lo sviluppo di batteri solfito-riduttori, la cui attività può corrodere e forare le pareti interne delle condutture, fenomeno comunemente chiamato “Microbially-Induced Corrosion” (MIC) (Geldreich, 1996; Kumar and Anand, 1998; Beaton, 2007; Javaherdashti, 2011).

Per questo motivo, il monitoraggio del biofilm svolge un ruolo chiave all'interno dei sistemi produttivi industriali.

IL TRATTAMENTO DELLE ACQUE NELLA PRODUZIONE DEI DISPOSITIVI MEDICI

L'acqua è utilizzata nelle officine di realizzazione dei dispositivi medici, come solvente, come diluente, per ricostituire i prodotti, durante le sintesi, come ingrediente delle preparazioni e come agente pulente delle apparecchiature, dei circuiti di distribuzione, del confezionamento primario, per la creazione di vapore, ecc. Le modalità di impiego dell'acqua ed i volumi necessari sono strettamente legati alla tipologia di dispositivo medico prodotto e quindi al ruolo che l'acqua ricopre nella catena di lavorazione dello stesso.

Si pensi alla differenza di utilizzo e di volume necessario di acqua ad esempio nel caso di realizzazione di forme liquide, come soluzioni per terapie renali continue sostitutive o gocce oculari, di dispositivi iniettabili, come dispositivi viscoelastici intra-articolari, o di dispositivi topici, come creme o gel o di dispositivi ad uso orale o destinati a disinfettare altri dispositivi. In tutti i casi l'acqua può essere utilizzata sia come materia prima che come agente pulente, ma i volumi cambiano in maniera sensibile così come la qualità microbiologica richiesta.

Inoltre il mantenimento delle caratteristiche chimiche dell'acqua utilizzata in produzione, risulta sicuramente un compito più semplice rispetto al mantenimento delle sue caratteristiche microbiologiche. Pertanto l'aspetto microbiologico è particolarmente critico e le aziende per tenerlo sotto controllo impegnano grandi risorse in strutture, controlli e personale.

I CRITERI DELLA FARMACOPEA

Per i dispositivi medici non sono ancora state emanate delle regole o delle linee guida specifiche e dedicate, ma vengono mutate le norme applicate al settore farmaceutico che, per molti aspetti, risulta sovrapponibile a quello dei dispositivi medici.

Le specifiche dell'acqua, per uso farmaceutico, sono riportate nelle monografie della Farmacopea sia italiana che europea e vengono costantemente aggiornate per riflettere lo stato dell'arte del progresso tecnologico e per cercare di uniformare gli standard a livello mondiale e venire incontro al mercato globale (European Pharmacopoeia 8.0; Farmacopea Ufficiale Della Repubblica Italiana XII).

Secondo le linee guida europee dell'European Medicines Agency (EMA), relative alle preparazioni farmaceutiche, ma applicabili anche ai dispositivi medici, si considerano tre diversi gradi della purezza dell'acqua: acqua depurata o purificata (PW – Purified Water), acqua per preparazioni iniettabili (WFI – Water for Injections) e acqua altamente depurata o purificata (HPW – Highly Purified Water).

Sempre secondo le linee guida europee dell'EMA, l'acqua depurata è indicata per tutte le preparazioni non sterili e non iniettabili, per le preparazioni sterili ad uso topico, orale, nasale, otologico ed oftalmico, mentre l'acqua per preparazioni iniettabili è indicata per dispositivi sterili ad uso parenterale, per soluzioni di emofiltrazione, per soluzioni per dialisi e per irrigazione, per dispositivi iniettabili.

La stessa linea guida fornisce anche delle indicazioni relativamente alla qualità di acqua da impiegare per i lavaggi. L'acqua potabile è indicata per il risciacquo iniziale, nella produzione delle materie prime e dei semilavorati, e per il primo lavaggio delle apparecchiature di produzione; l'acqua depurata è indicata, nel caso di dispositivi non iniettabili e che non sono prodotti con acqua

WFI, per tutti i lavaggi intermedi e per i risciacqui finali, per il lavaggio di tutti gli strumenti che non sono sottoposti a lavaggi e risciacqui multipli; infine l'acqua per preparazioni iniettabili è indicata, nel caso di dispositivi sterili ed iniettabili, per i risciacqui finali o per i lavaggi singoli.

Per garantire e mantenere una determinata qualità dell'acqua, è necessario un sistema di trattamento che richiede una progettazione, una installazione, una qualifica, una validazione ed una corretta manutenzione, in modo da garantire una produzione di acqua con il grado di purezza richiesto ed in grado di erogare i volumi necessari alla produzione.

Non esiste una sola tipologia di trattamento ma, possono cambiare o venire associati in cascata per garantire maggiore confidenza del risultato finale; unico fattore imprescindibile rimangono le caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche che le differenti qualità di acqua devono rispettare per potersi considerare WFI, PW o HPW o anche solo acqua potabile.

Nello specifico, la produzione dell'**acqua depurata** avviene a partire dall'acqua potabile mediante demineralizzazione o deionizzazione a scambio ionico o altri metodi adeguati. Questo tipo di processo garantisce una buona qualità chimica dell'acqua, ma non sempre una buona qualità microbiologica. L'**acqua per preparazioni iniettabili** è la più critica tra le varie tipologie di acqua utilizzata nel settore farmacologico e dei dispositivi medici, dato che viene impiegata in prodotti che sono loro stessi di elevata criticità e che spesso entrano in contatto con il sangue. L'acqua per preparazioni iniettabili viene utilizzata anche per i risciacqui finali delle apparecchiature dei prodotti iniettabili e dei prodotti che non saranno sottoposti ad una successiva depirogenizzazione finale termica o chimica. Questa qualità di acqua si differenzia dalle altre per degli standard rigidi dal punto di vista microbiologico e chimico-fisico.

La produzione parte dall'acqua depurata ed avviene tramite distillazione in apparecchi che abbiano le pareti a contatto con l'acqua di materiali scelti (di vetro, di quarzo o di metalli opportuni) che evitino ristagni o gocciolamenti.

Fondamentale per l'acqua per preparazioni iniettabili è il controllo dei limiti delle endotossine, della conducibilità e del Total Organic Carbon (TOC).

L'**acqua altamente depurata**, infine, è stata introdotta nella Farmacopea Ufficiale solo dal gennaio 2002 (non è trattata in altre normative o linee guida mondiali), e rappresenta una qualità di acqua che può essere utilizzata in tutte le preparazioni di dispositivi medici tranne che per quelle in cui sia richiesto l'utilizzo dell'acqua per preparazioni iniettabili.

Per la preparazione si può partire da acqua potabile, ma sarebbe più opportuno, per ottenere risultati migliori, partire da acqua depurata, e si possono utilizzare dei sistemi di doppia osmosi inversa associati a tecniche di deionizzazione o demineralizzazione e di ultrafiltrazione. Il metodo di produzione utilizzato non viene considerato affidabile quanto quello della distillazione e pertanto, pur raggiungendo degli standard simili, se non uguali in alcuni casi, con quelli dell'acqua per preparazioni iniettabili, le due qualità di acqua rimangono su due livelli separati. L'acqua altamente depurata può essere utilizzata in alcuni dispositivi medici sterili come i prodotti oftalmici, otologici, nasali o topici.

DAI RISULTATI DEL PROGETTO SPERIMENTALE ALLE RACCOMANDAZIONI

Le raccomandazioni espresse nella linea guida sono basate sulla evidenza scientifica proveniente dall'elaborazione di dati raccolti tramite un questionario informativo e di quelli derivati direttamente dalla sperimentazione di laboratorio.

Il questionario informativo ha avuto lo scopo di raccogliere dati sulle responsabilità, modalità di gestione e di controllo delle principali attività connesse con l'implementazione, l'utilizzo, la manutenzione dei sistemi di trattamento dell'acqua nelle aziende che realizzano dispositivi medici ed è stato compilato sulla base delle interviste rivolte ai rappresentanti delle aziende durante i sopralluoghi.

Ogni documento, compilato sulla base delle interviste rivolte ai rappresentanti delle aziende durante i sopralluoghi e contenente dati sensibili rimasti codificati, ha fornito elementi utili per elaborare le raccomandazioni presentate in questa linea guida.

La fase sperimentale ha riguardato la ricerca di microrganismi, come Conta Batterica Totale (CBT) a 22° C e 37° C, la cui ricerca è già prevista dalla Farmacopea, batteri, come *E. coli* ed Enterococchi intestinali che sono indicatori di inquinamento fecale, ed alcuni patogeni, come *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.*, che possono costituire un potenziale rischio per la salute umana.

I prelievi sono stati eseguiti in particolari punti di campionamento, laddove possibile, in coincidenza con i normali punti di monitoraggio dell'azienda, una volta al mese per tre mesi consecutivi.

Data la diversità dei sistemi di trattamento e distribuzione, sono stati individuati 5 punti comuni ad ogni azienda che fossero rappresentativi dell'impianto e dei possibili punti di criticità, così definiti:

Punto 1: acqua in ingresso

Punto 2: acqua dopo trattamento con osmosi inversa

Punto 3: acqua dopo secondo trattamento (distillazione, filtrazione, ecc.)

Punto 4: punto di prelievo nell'area lavaggio

Punto 5: punto di utilizzo più lontano dal punto di ingresso.

LE RACCOMANDAZIONI

Raccomandazione 1 - La Farmacopea

In assenza di norme specifiche, per il monitoraggio e il controllo delle acque utilizzate nel settore dei dispositivi medici, attualmente si mutano le indicazioni presenti nella Farmacopea.

Tutte le aziende che hanno partecipato allo studio applicano tali indicazioni, anche se non obbligatorie, rimodulando, se necessario, i valori di riferimento e guida, a seconda delle necessità di produzione.

RACCOMANDAZIONE 1

In assenza di norme specifiche, si raccomanda di seguire le indicazioni della Farmacopea anche per il settore dei dispositivi medici

*Forza della raccomandazione A
Livello di Prova IV*

Nello specifico, la forza della raccomandazione (A) è determinata dall'importanza di seguire parametri e limiti che garantiscano l'ottenimento delle specifiche richieste già consolidati, anche se non per il settore d'applicazione, in mancanza di altri specifici riferimenti normativi.

Il livello di prova (IV) deriva dal valore normativo dell'applicazione delle prescrizioni della Farmacopea, superiore ad ogni indagine sperimentale o raccolta dati.

La Conta Batterica Totale (CBT) rappresenta un metodo di analisi della qualità microbica generale dell'acqua. Il metodo è in grado di rilevare la presenza, in termini non specifici, di batteri, spore batteriche, microrganismi di origine fecale, così come di ospiti naturali degli ambienti acquatici.

Il conteggio delle colonie batteriche è uno dei più affidabili e sensibili indicatori dell'inefficacia della disinfezione, della ricrescita dei batteri nei sistemi di distribuzione e della formazione di biofilm.

Il conteggio delle colonie batteriche a 22° C è un indicatore di scarso significato sanitario, ma è utile per valutare se l'acqua è soggetta a contaminazioni di natura ambientale, per valutare l'efficacia del trattamento dell'acqua o del sistema.

Un incremento nel conteggio delle colonie batteriche a 37° C può rappresentare un segnale precoce di inquinamento e un possibile inquinamento di natura fecale.

I principali fattori che determinano la ricrescita sono la temperatura, la disponibilità di nutrienti (che possono derivare dall'acqua di partenza o dai materiali in contatto con essa, dalla mancanza o insufficienza della disinfezione o per la presenza di deviazioni nelle procedure (per una descrizione dei metodi applicati nel conteggio delle colonie a 22° C ed a 37° C si veda l'Allegato 1).

Di conseguenza in questo studio, la caratterizzazione microbiologica delle acque, utilizzate nelle varie fasi della produzione industriale, ha riguardato prima di tutto i parametri già previsti dalla Farmacopea, quali Conta Batterica Totale (CBT) a 22° C ed a 37° C.

I risultati dello studio hanno mostrato una sostanziale uniformità al di sotto dei valori limite individuati dalla Farmacopea per le due Contate Batteriche Totali (Fig. 2). Si sono comunque riscontrati casi di valori maggiori per il 10,1% per la CBT 37° C e per il 10,5% per la CBT 22° C. Si è osservato che questi casi sono generalmente riconducibili a deviazioni nel sistema di trattamento dell'acqua o della sua gestione.

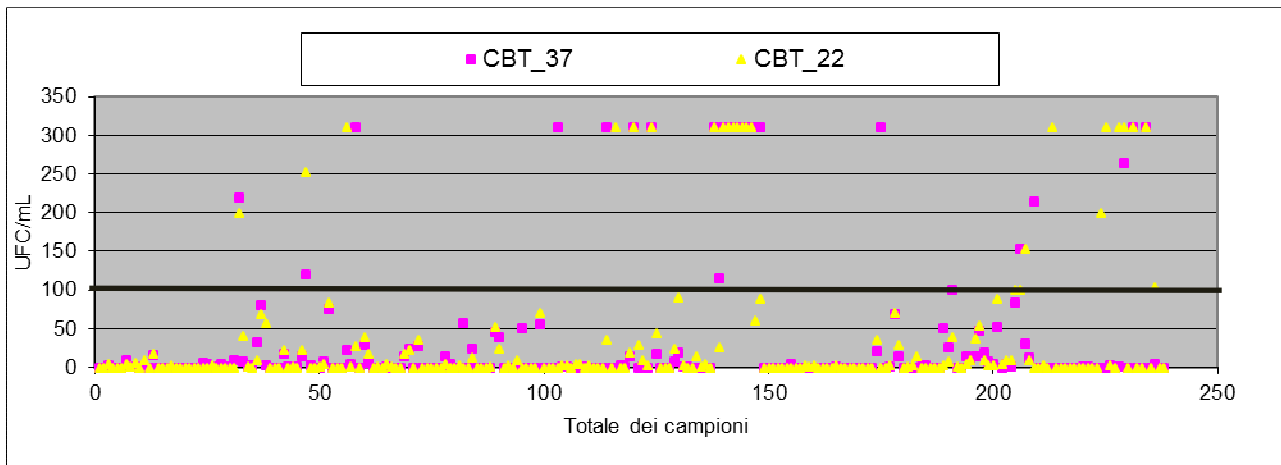


Figura 2. Valori della Conta Batterica Totale (CBT) a 22° C e a 37° C per il totale dei campioni

L'utilizzo della Farmacopea, sia pur non obbligatorio per il settore dei dispositivi medici, risulta comunque ormai consolidato, poiché individua parametri microbiologici e i loro limiti già utilizzati dalle officine farmaceutiche e riconosciuti a livello nazionale ed internazionale.

L'applicazione della Farmacopea anche al settore dei dispositivi non può quindi essere contestata, data anche la similitudine degli impianti di trattamento dell'acqua, delle apparecchiature, delle procedure di produzione e di lavaggio dei due settori, ma potrebbe a necessità essere integrata.

Le monografie delle Farmacopee sono in costante evoluzione in adeguamento, sia al processo tecnologico che al processo di armonizzazione normativa.

È importante ricordare inoltre che le tre Farmacopee di riferimento, italiana, europea e statunitense, non risultano sempre allineate nei concetti, nei parametri e nei limiti definiti. Un significativo passo di avvicinamento della Farmacopea Europea (Ph.Eur.) verso la Farmacopea degli Stati Uniti (USP) è stato, ad esempio, l'introduzione di nuovi test strumentali per il controllo di qualità dell'acqua in bulk. Così anche l'introduzione della monografia "Acqua altamente depurata" da parte della Ph.Eur. IV rende disponibile per la produzione farmaceutica un nuovo grado di acqua.

Per quanto riguarda i limiti dei valori delle analisi microbiologiche, la Ph.Eur. include i limiti microbiologici nelle parti vincolanti delle sue monografie e nello specifico essi sono 100 UFC/mL per la PW.

La USP invece, non li esplicita nelle corrispondenti monografie, ma li indica in forma di raccomandazione nelle linee-guida comprese nel capitolo generale "Water for pharmaceutical purposes" ed hanno gli stessi valori limite riportati nella Ph.Eur (Barletta, 2002; Kudernatsch, 2002).

Sempre nella USP viene fatta la descrizione dei "Livelli di Allerta e di Allarme" (*Alert and Action Levels*) (USP, 2002) il cui scopo è di segnalare un possibile cambiamento nelle prestazioni del

processo di produzione dell'acqua (ISPE, 2001). Tali limiti, (stabiliti autonomamente da ogni singolo produttore farmaceutico e comunque inferiori ai limiti prescritti dalle Farmacopee), sono distinti dai parametri di processo e dalle specifiche del prodotto finito, per il fatto che essi sono usati per monitorare e controllare il processo, piuttosto che per accettare o respingere i risultati inerenti all'acqua prodotta (Santoro, 2003). Quindi i Livelli di Allerta (o attenzione), quando superati, indicano che il processo potrebbe essersi allontanato dalle normali condizioni operative, essi costituiscono un avvertimento e non richiedono necessariamente un'azione correttiva, mentre i Livelli di Allarme (o intervento), quando superati, indicano che un processo si è allontanato dal range operativo normale ed è necessario intraprendere un'azione correttiva per riportare il processo nei limiti della normalità. I due limiti, adottati anche nelle monografie della Ph.Eur., hanno lo scopo di salvaguardare sia le caratteristiche di qualità del prodotto, che la capacità di controllare efficacemente il processo di purificazione.

I dati di monitoraggio e l'analisi dell'andamento dei dati sono usati per valutare le prestazioni del processo e prevedere eventuali deviazioni dai parametri (Santoro, 2003).

Raccomandazione 2 - Acque “di partenza”

L'acqua potabile, anche se controllata rigidamente da normative nazionali (in Italia la Direttiva 98/83/CE recepita con il D. Lgs. 31 del 02/02/2001), potrebbe presentare al suo interno sostanze per le quali, in assenza di un trattamento specifico, non potrebbe essere utilizzata come materia prima di un dispositivo medico. L'acqua potabile rappresenta normalmente l'ingresso di quasi tutti i sistemi di trattamento industriale, tuttavia a volte l'approvvigionamento può avvenire da altre fonti, come per esempio pozzi o cisterne. Molte sono le variabili che possono incidere sulla qualità dell'acqua di pozzo, come la stagionalità, le eccessive precipitazioni e i periodi di siccità, le attività effettuate a scala di bacino che potrebbero confluire nelle acque sotterranee attraverso il dilavamento o gli eventi avversi (pascoli, discariche, concimazioni organiche e chimiche, ecc.).

RACCOMANDAZIONE 2

Nel caso in cui l'approvvigionamento non venga da rete idropotabile, è importante eseguire dei trattamenti aggiuntivi

*Forza della raccomandazione A
Livello di Prova III*

Nello specifico, la forza della raccomandazione (A) è determinata dall'importanza di ottenere, qualsiasi sia la fonte di approvvigionamento, un'acqua in ingresso con caratteristiche definite e idonee ai successivi trattamenti previsti.

Il livello di prova (III) deriva dall'applicazione costante delle buone pratiche di produzione, data la necessità tecnica di pretrattare l'acqua in ingresso.

Dallo studio si evidenzia come la maggior parte delle aziende (81%), utilizzi acqua di rete, protetta e monitorata, e solo una piccola percentuale (19%) utilizzi quelle sotterranee. In alcune situazioni territoriali, infatti, l'acqua sotterranea è l'unica fonte di approvvigionamento e, pertanto, proprio in questi casi si ritiene utile rafforzare i trattamenti ed il monitoraggio.

Quando l'acqua potabile deriva dalla rete si è certi che questa venga monitorata costantemente dalle autorità nazionali e regionali; quando invece l'acqua è potabilizzata direttamente dallo stabilimento di produzione del dispositivo medico, è necessario svolgere un monitoraggio serrato di tutte le fasi del pre-trattamento, di potabilizzazione, con particolare riguardo agli eventuali sistemi di stoccaggio. Tutte le fasi di controllo e monitoraggio devono essere sottoposte a procedure standardizzate e correttamente registrate per garantire l'applicazione delle buone pratiche di produzione ed il controllo dei dati riscontrati nel tempo e delle loro eventuali variazioni.

Alcuni dei principali processi di potabilizzazione dell'acqua, utilizzati anche dalle autorità nazionali, sono la filtrazione (ultrafiltrazione, microfiltrazione e filtri multimediali), l'addolcimento, la disinfezione o sanitizzazione (per esempio con l'aggiunta di ipoclorito di sodio), la rimozione del ferro, la precipitazione e la riduzione di specifici materiali organici/inorganici, il passaggio sotto lampade UV. In particolare si è riscontrato che il 13% delle aziende coinvolte nello studio esegue un ulteriore trattamento di potabilizzazione.

Raccomandazione 3 - Campionamento

La fase del campionamento rappresenta un passaggio cruciale dell'intero processo di monitoraggio e di controllo in quanto potrebbe inficiare, se non eseguito correttamente, i risultati dell'indagine.

Nella Linea Guida dell'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i servizi Tecnici (APAT, 2003) il campionamento è definito come *“una fase estremamente complessa e delicata che condiziona i risultati di tutte le operazioni successive e che di conseguenza incide in misura non trascurabile sull'incertezza totale del risultato dell'analisi. Gli studi disponibili mettono in evidenza che l'incertezza associata al campionamento può contribuire anche per il 30-50% all'incertezza associata al risultato analitico finale ed è di gran lunga più elevata rispetto all'incertezza associata alla fase analitica (circa il 5%)”*.

Le diverse fasi che precedono le analisi, quali il campionamento, l'etichettatura, il trasporto e la conservazione del campione, possono incidere sull'attendibilità e l'affidabilità dei risultati analitici. Per evitare che vi siano contaminazioni secondarie del campione, risulta pertanto essenziale che siano osservate le *buone pratiche di laboratorio* e le norme di settore (UNI EN ISO 19458:2006).

Il campionamento deve essere eseguito da personale qualificato, il quale deve essere opportunamente formato e messo a conoscenza sia delle tecniche di campionamento sia degli accorgimenti tecnici necessari per la corretta esecuzione delle determinazioni richieste (UNI EN ISO 5667-3:2004; UNI EN ISO 5667-1:2007).

RACCOMANDAZIONE 3

È importante eseguire il campionamento lasciando scorrere l'acqua, aprendo e chiudendo il rubinetto 2 o 3 volte, al massimo flusso, per 5-10 secondi per volta

*Forza della raccomandazione B
Livello di Prova III*

Nello specifico, la forza della raccomandazione (B) è determinata dalla variabilità nelle procedure di prelievo dei campioni della realizzazione tecnica dei punti di prelievo, che potrebbero non richiedere obbligatoriamente l'applicazione di questa raccomandazione. Si ritiene tuttavia che la raccomandazione stessa debba essere sempre attentamente considerata in fase di definizione dei protocolli di campionamento nell'ambito del controllo qualità.

Il livello di prova (III) deriva dall'applicazione costante delle buone pratiche di laboratorio e delle norme di settore.

Lo studio ha dimostrato come non ci sia uniformità tra le aziende in termini di procedure applicate per il campionamento, ma soprattutto in termini di strutture, ambienti ed accorgimenti tecnici adottati. Nello specifico, a seconda della struttura fisica dell'impianto e della conseguente conformazione di ogni sito di prelievo, si possono avere degli ugelli liberi o collegati a tubi di

raccordo, a volte indispensabili per raggiungere i punti di prelievo strutturalmente posizionati in luoghi non facilmente raggiungibili.

Dallo studio condotto si è visto che il 13% delle ditte coinvolte utilizzavano tubi di raccordo nelle procedure di campionamento.

La presenza di tubi di raccordo può contribuire all'introduzione di una contaminazione microbiologica secondaria, in particolar modo quando questi tubi di raccordo non siano mobili e sterili, ma fissi.

Anche il caso degli ugelli liberi non è privo di possibili problemi. Nel segmento di calata relativo ad ogni singolo punto di prelievo, l'acqua non risulta sempre in circolo come nel "*loop*" di distribuzione del sistema di trattamento, ma ristagna. Tale situazione comporta una possibile crescita batterica non controllata; risulta quindi fondamentale eliminare questa parte di liquido prima di effettuare un campionamento.

La pratica di far scorrere l'acqua (solitamente per 5-10 secondi o più a seconda della struttura e della portata dell'ugello) aiuta pertanto a minimizzare eventuali contaminazioni aggiuntive introdotte da un ristagno di acqua o di umidità dall'utilizzo precedente.

Raccomandazione 4 - Campionamento

Per ridurre eventuali contaminazioni presenti a livello del punto di prelievo, la norma UNI EN ISO 19458:2006 raccomanda di disinfettarlo, immergendolo per almeno 2 minuti in una soluzione diluita di ipoclorito di sodio, o flambando l'ugello.

Tale pratica consente di eliminare eventuali batteri presenti nella parte terminale del punto di prelievo da dove uscirà l'acqua e che entrerà in contatto con il contenitore utilizzato per il campionamento. Il flambaggio, tuttavia, se effettuato in modo superficiale, non esplica alcun effetto sull'eventuale presenza di contaminazione batterica. Per la produzione della fiamma è consigliato utilizzare gas propano o butano che permettono, da una parte, di raggiungere temperature più elevate e, dall'altra, di controllare la fiamma.

RACCOMANDAZIONE 4

È necessario eseguire il campionamento sanitizzando o flambando l'ugello di prelievo

*Forza della raccomandazione **B**
Livello di Prova **III***

Nello specifico, la forza della raccomandazione (B) è determinata dalla variabilità nelle procedure di prelievo dei campioni e della realizzazione tecnica dei punti di prelievo che potrebbero non richiedere obbligatoriamente l'applicazione di questa raccomandazione. Si ritiene tuttavia che la raccomandazione stessa debba essere sempre attentamente considerata in fase di definizione dei protocolli di campionamento nell'ambito del controllo qualità.

Il livello di prova (III) deriva dall'applicazione costante delle buone pratiche di laboratorio e delle norme di settore.

Dallo studio condotto il 13% delle aziende, prima di campionare, flamba l'ugello ed il 19% lo disinfetta.

Raccomandazione 5 - Campionamento

Il processo di campionamento, anche se correttamente eseguito, presenta delle criticità aggiuntive introdotte dall'operatore che può, per mancanza di formazione o solo di attenzione, tralasciare alcune accortezze ed introdurre una contaminazione aggiuntiva dall'esterno.

Tale contaminazione comporterebbe un falso positivo nelle analisi che evidenzerebbero una contaminazione dell'acqua realmente non presente, ma introdotta solo nello specifico campione dall'imperizia dell'operatore.

L'errore umano non può essere eliminato dato che risulta spesso imprevedibile, ma può essere minimizzato inserendo degli elementi di riduzione del rischio. Tra questi, i più efficaci sono l'utilizzo di guanti, che proteggono dalla possibile contaminazione che può derivare dal contatto diretto del punto o del contenitore di prelievo con la mano dell'operatore, e di mascherine, che proteggono dalla possibile contaminazione del campione prelevato con particelle di saliva dell'operatore.

RACCOMANDAZIONE 5

È importante eseguire il campionamento utilizzando dispositivi di protezione individuale (guanti, ecc.)

*Forza della raccomandazione **B**
Livello di Prova **III***

Nello specifico, la forza della raccomandazione (B) è determinata dalla variabilità nelle procedure di prelievo dei campioni e della realizzazione tecnica dei punti di prelievo che potrebbero non richiedere obbligatoriamente l'applicazione di questa raccomandazione. Si ritiene tuttavia che la raccomandazione stessa debba essere sempre attentamente considerata in fase di definizione dei protocolli di campionamento nell'ambito del controllo qualità.

Il livello di prova (III) deriva dall'applicazione costante delle buone pratiche di laboratorio e delle norme di settore.

Dallo studio condotto si è riscontrato che il 75% degli operatori durante il campionamento ha utilizzato guanti.

Le raccomandazioni che seguono riguardano strettamente i parametri microbiologici utilizzati nella valutazione della qualità delle acque e per individuare potenziali rischi strettamente legati sia al sistema gestionale che alla filiera di produzione.

Raccomandazione 6 - *Pseudomonas spp.*

La famiglia delle Pseudomonadaceae (Garrity *et al.*, 2005) comprende organismi ubiquitari che preferiscono gli ambienti umidi. La famiglia comprende anche specie potenzialmente patogene, come *Pseudomonas aeruginosa* (Palleroni, 2005).

P. aeruginosa è un aerobio Gram-negativo, a forma di bastoncello. Quasi tutti i ceppi sono motili grazie a un flagello polare. Si tratta di un microrganismo aerobio/anaerobio facoltativo.

Il suo optimum di temperatura di crescita è 37° C, ma è capace di crescere a temperature superiori a 42° C. È ubiquitario: si trova nel suolo, nell'acqua (nei sistemi d'acqua condottati, nei sistemi d'acqua calda e nelle piscine termali) e sulle superfici a contatto con acqua e suolo, dove può trovarsi associato in biofilm. L'acqua è una riserva ideale di questi microrganismi. La maggior parte delle malattie di cui *P.aeruginosa* è responsabile non derivano dall'ingestione dell'acqua contaminata, ma dal contatto con essa. L'acqua che contiene questi batteri può contaminare cibi, bevande e prodotti farmaceutici, causandone il deterioramento e rendendoli una fonte secondaria di trasmissione. Anche le strutture in contatto con l'acqua, come lavandini e scarichi, rubinetti e docce, possono essere contaminati da *P. aeruginosa* e possono costituire una riserva d'infezione. È resistente ad alte concentrazioni di sali e a deboli antisettici e a molti comuni antibiotici. Questa naturale proprietà del batterio contribuisce al suo stesso successo ecologico come un patogeno opportunisto.

La presenza di *Pseudomonas spp.* è uno dei fattori da prendere in considerazione nella valutazione generale dell'igiene dei sistemi di distribuzione e della qualità dell'acqua. In genere si rinviene nei sistemi di distribuzione in cui c'è un basso flusso ed un aumento della temperatura. È un ottimo indicatore comunemente utilizzato per identificare la presenza di biofilm (Whiteley *et al.*, 2001).

RACCOMANDAZIONE 6

*È necessario eseguire analisi per la ricerca di **Pseudomonas spp***

*Forza della raccomandazione **A**
Livello di Prova **I***

Nello specifico, la forza della raccomandazione (A) è determinata dall'importanza di valutare la presenza del parametro in esame, al fine di garantire una qualità dell'acqua compatibile con le specifiche richieste.

Il livello di prova (I), deriva da prove ottenute da analisi microbiologiche della totalità dei campioni eseguite in replicato (tre repliche) con controlli positivi e negativi.

Attraverso i risultati sperimentali si è evidenziata una costante presenza di *Pseudomonas spp.* (Fig. 3 e Fig. 4) nei siti campionati, anche quando la CBT a 22° C e 37° C risultano essere nei limiti (Fig. 5). La descrizione del metodo utilizzato per la ricerca dello *Pseudomonas spp.* è riportato in allegato

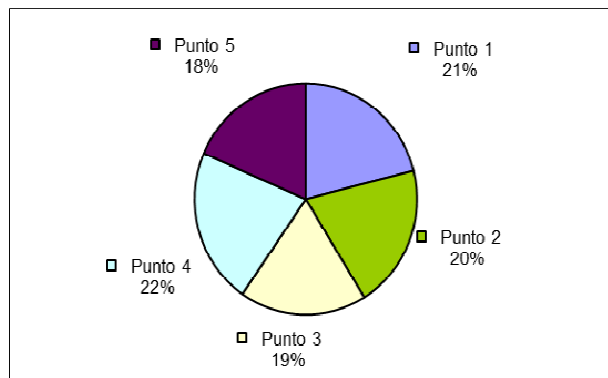


Figura 3. Percentuale di campioni positivi per *Pseudomonas spp.*, divisi per sito di prelievo

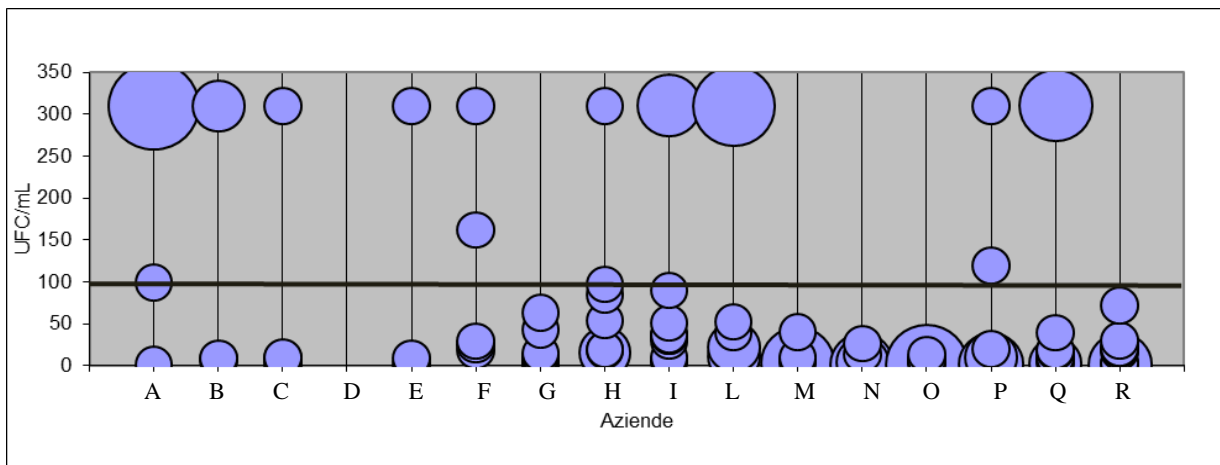


Figura 4. Ogni bolla rappresenta la numerosità del medesimo valore riscontrato, per il totale dei campioni di ogni azienda

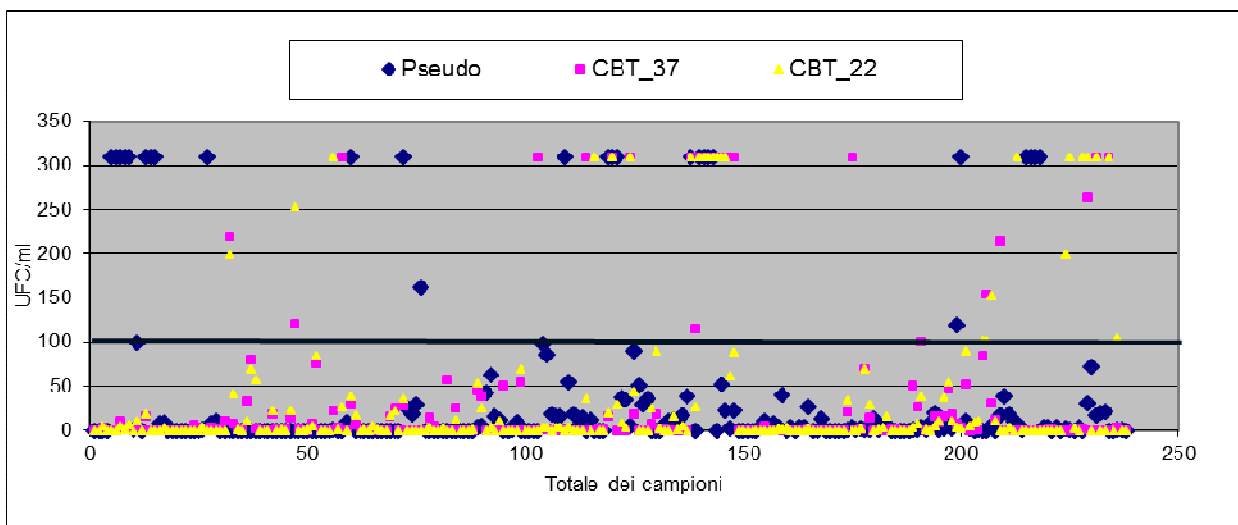


Figura 5. Valori di *Pseudomonas spp.* confrontati con la CBT a 22° C e a 37° C, in ogni punto di prelievo a parità di sito e di data di campionamento

Raccomandazione 7 - *Staphylococcus spp.*

Sono cocchi Gram-positivi e comprendono specie potenzialmente patogene, tra cui *Staphylococcus aureus*. Questo, non mobile, generalmente privo di capsula, asporigeno e anaerobio facoltativo, fermenta il glucosio principalmente in acido lattico e fermenta il mannitolo; è catalasi positivo e coagulasi positivo o negativo (importante nell'identificazione di routine di *S. aureus*, ossidasi negativo). Cresce a tra 15°-45° C ed in alte concentrazioni di NaCl (Schleifer e Bell, 2009).

È un microrganismo che vive nell'ambiente (suolo, sabbie, polvere, aria e acque naturali) dove è molto resistente, e frequentemente fa parte della normale microflora degli animali omeotermi compreso l'uomo. In particolare, nel 20-40% degli adulti è ospite del nasofaringe, dove costituisce una riserva di infezione, e viene diffuso soprattutto attraverso le mani.

Il cibo e l'acqua potabile possono essere contaminati da soggetti portatori di lesioni stafilococciche cutanee, specialmente delle mani. La presenza di *S. aureus* nell'acqua è considerata un utile indicatore di inquinamento dell'acqua. *S. aureus* è in grado di sopravvivere a lungo e di riprodursi anche nei sistemi di distribuzione; è resistente all'azione del cloro.

RACCOMANDAZIONE 7

*È necessario eseguire analisi per la ricerca di *Staphylococcus spp.**

Forza della raccomandazione A
Livello di Prova I

Nello specifico, la forza della raccomandazione (A) è determinata dall'importanza di valutare la presenza dell'parametro in esame al fine di garantire una qualità dell'acqua compatibile con le specifiche richieste.

Il livello di prova (I) deriva da prove ottenute da analisi microbiologiche della totalità dei campioni eseguite in replicato (tre repliche) con controlli positivi e negativi.

Dai risultati sperimentali si è osservata una costante presenza di *Staphylococcus spp.* (Fig. 6 e Fig. 7) nei siti campionati, anche quando le CBT a 22° C e 37° C risultano essere nei limiti (Fig.8). La descrizione del metodo utilizzato per la ricerca dello *Staphylococcus spp.* è riportato nell'Allegato 1.

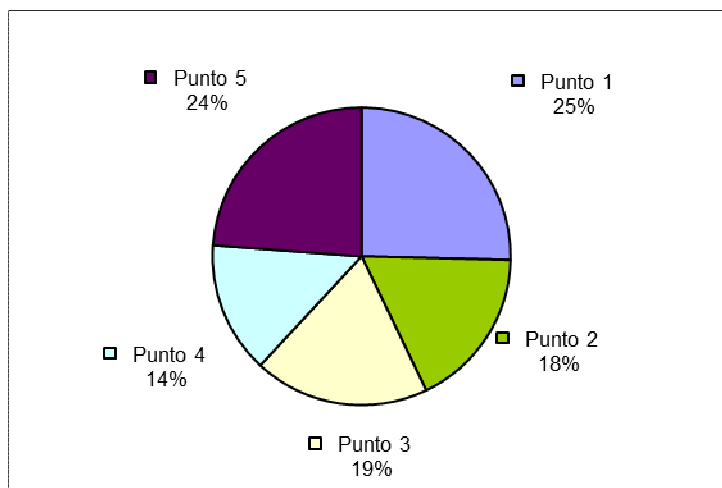


Figura 6. Percentuale di campioni positivi per *Staphylococcus* spp, divisi per sito di prelievo

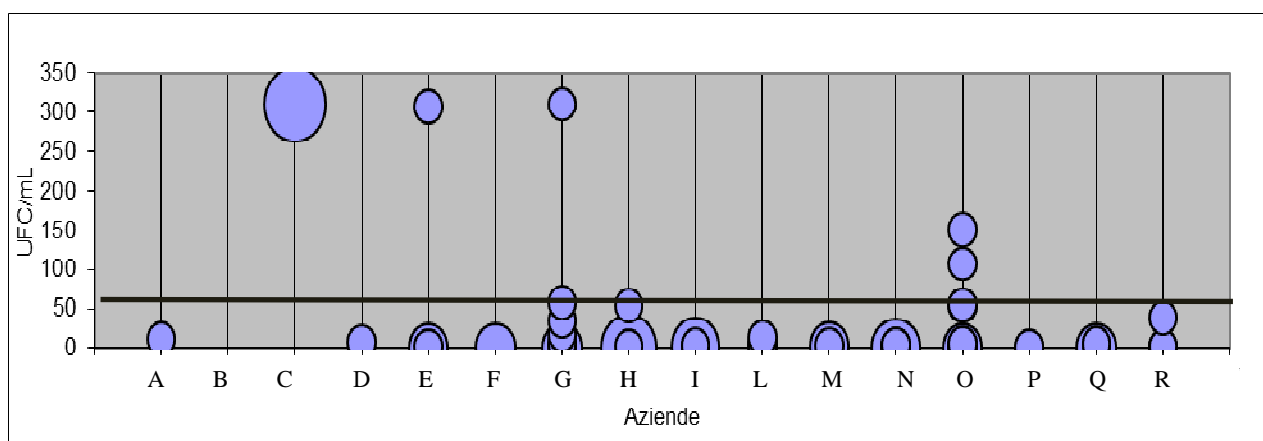


Figura 7. Ogni bolla rappresenta la numerosità del medesimo valore riscontrato, per il totale dei campioni di ogni azienda

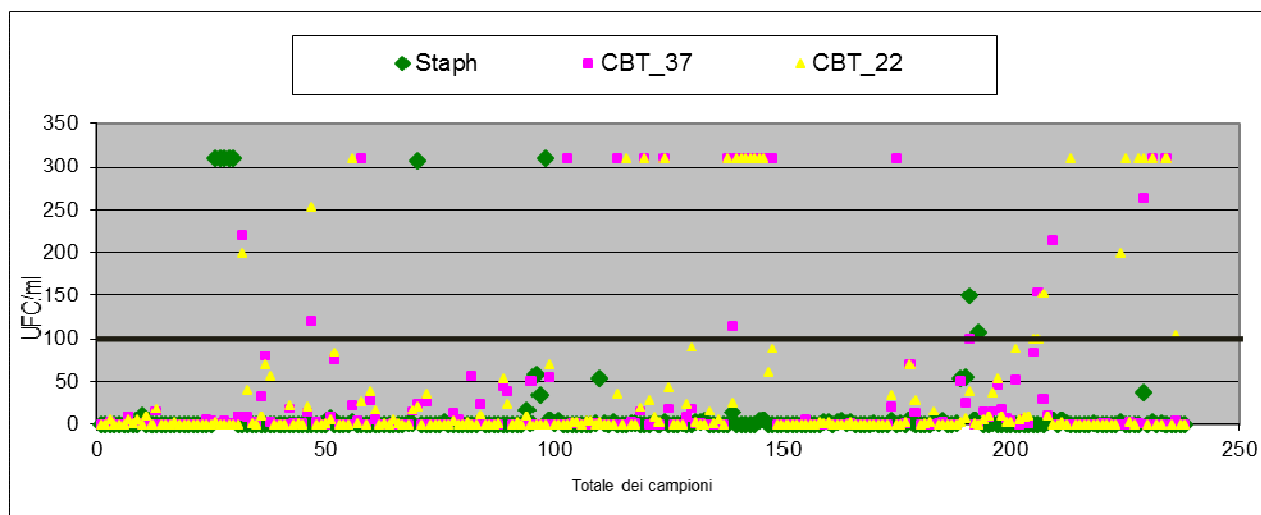


Figura 8. Valori di *Staphylococcus* spp. confrontati con la CBT a 22° C e a 37° C, in ogni punto di prelievo a parità di sito e di data di campionamento

Raccomandazione 8 - Enterococchi intestinali

Sono batteri Gram-positivi, di forma tondeggianti (possono trovarsi singolarmente o a coppie o sottoforma di corte catene), anaerobi facoltativi e catalasi negativi (Švec and Devriese, 2009). Il sottogruppo degli Enterococchi intestinali comprende le specie *E.faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*. Gli Enterococchi sono presenti nelle feci di uomini e animali. La maggior parte delle specie isolate dalle fonti di acqua contaminata si rivelano di origine fecale. Occasionalmente sono presenti in altre matrici come il suolo, in assenza di inquinamento fecale. Gli Enterococchi intestinali sono utilizzati come indicatore di inquinamento fecale. La maggior parte delle specie non si moltiplica negli ambienti acquatici ma sopravvive a lungo nell'acqua e sono molto resistenti all'essiccamento e alla disinfezione con cloro. Per questo motivo, vengono usati come indicatori dopo il posizionamento di nuove condutture o la riparazione di quelle esistenti. Vengono usati per valutare la possibile presenza, nelle acque grezze, di patogeni fecali che sopravvivono più a lungo di *E. coli*.

RACCOMANDAZIONE 8

È consigliabile eseguire l'analisi per la ricerca degli Enterococchi in seguito a deviazioni che potrebbero coinvolgere gli impianti di trattamento o la loro gestione

*Forza della raccomandazione A
Livello di Prova I*

Nello specifico, la forza della raccomandazione (A) è determinata dall'importanza di valutare la presenza dell'parametro in esame al fine di garantire una qualità dell'acqua compatibile con le specifiche richieste.

Il livello di prova (I) deriva da prove ottenute da analisi microbiologiche della totalità dei campioni eseguite in replicato (tre repliche) con controlli positivi e negativi.

Dai risultati sperimentali si è osservata la presenza di *Enterococchi* (Fig. 9 e Fig. 10) solo in alcuni dei siti campionati. La descrizione del metodo utilizzato per la ricerca degli *Enterococchi* è riportato nell'Allegato 1.

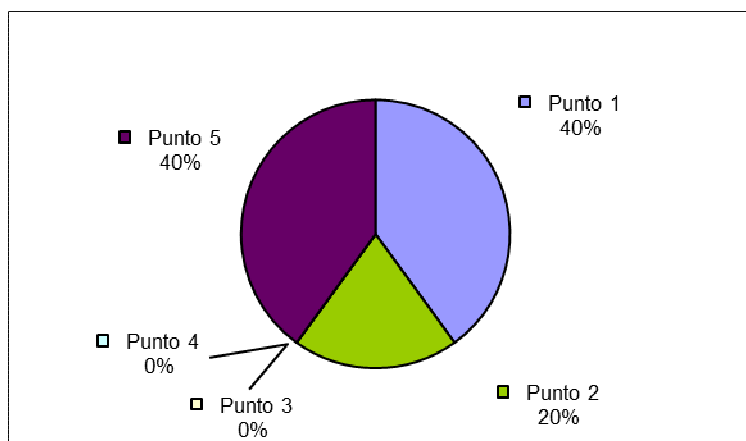


Figura 9. Percentuale di campioni positivi per Enterococchi, divisi per sito di prelievo

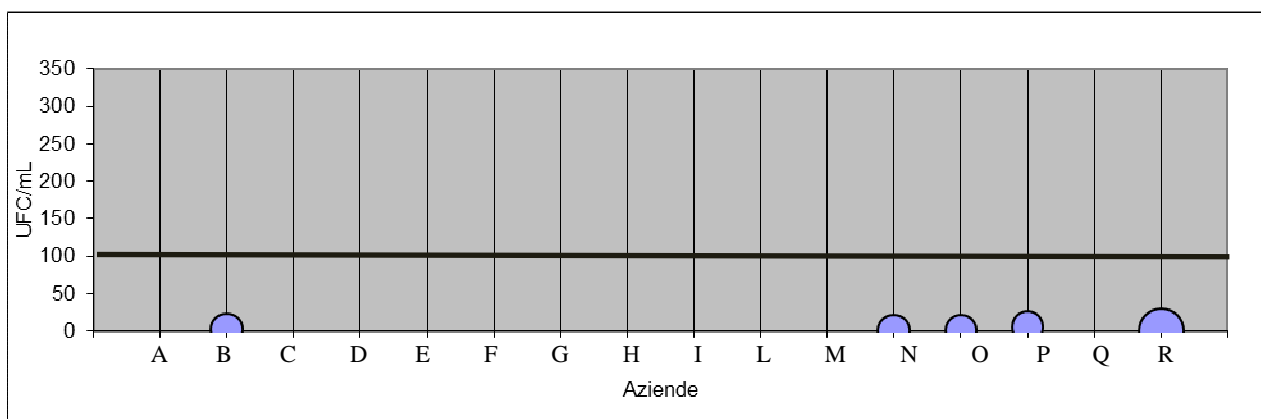


Figura 10. Ogni bolla rappresenta la numerosità del medesimo valore riscontrato, per il totale dei campioni di ogni azienda

Raccomandazione 9 - *Escherichia coli*

Escherichia coli è un batterio a forma di bastoncello, Gram-negativo, anaerobio facoltativo; fermenta il lattosio con produzione di gas e di acido alla temperatura di $44^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C in 24-48 ore. *Escherichia coli* si caratterizza per la capacità di produrre indolo dal triptofano o per la produzione dell'enzima β -glucuronidasi. Si trova comunemente nella parte inferiore dell'intestino di animali a sangue caldo (endotermici). La scelta di *Escherichia coli* come indicatore primario è stata motivata dalla maggiore stabilità della sua presenza nell'ambiente acquatico rispetto ad altri microrganismi. Nonostante sia incapace di moltiplicarsi in acqua, la sua presenza indica un recente inquinamento fecale (Scheutz and Strockbine, 2009).

RACCOMANDAZIONE 9

*È consigliabile eseguire analisi per la ricerca degli *Escherichia coli* in seguito a deviazioni che potrebbero coinvolgere gli impianti di trattamento acqua o la loro gestione*

*Forza della raccomandazione A
Livello di Prova I*

Nello specifico, la forza della raccomandazione (A) è determinata dall'importanza di valutare la presenza dell'parametro in esame al fine di garantire una qualità dell'acqua compatibile con le specifiche richieste.

Il livello di prova di tipo (I) deriva da prove ottenute da analisi microbiologiche della totalità dei campioni eseguite in replicato (tre repliche) con controlli positivi e negativi.

Dai risultati sperimentali si è osservata la presenza di *Escherichia coli* solo in alcuni dei siti campionati (Fig. 11, Fig. 12 e Fig. 13). La descrizione del metodo utilizzato per la ricerca degli *Escherichia coli* è riportato nell'Allegato 1.

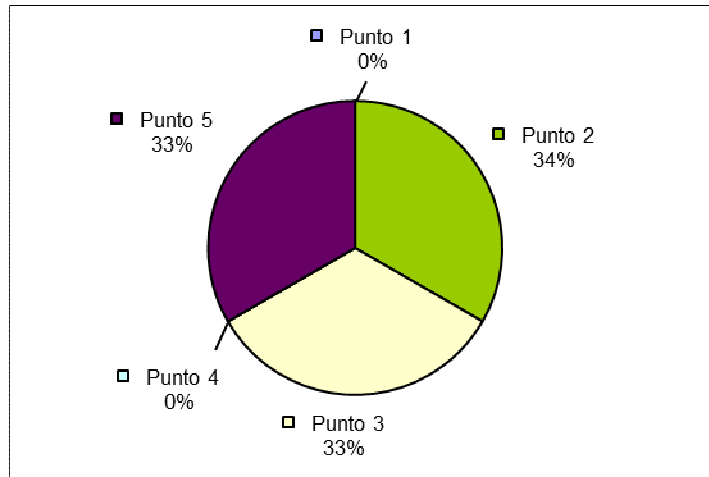


Figura 11. Percentuale di campioni positivi per Escherichia coli, divisi per sito di prelievo

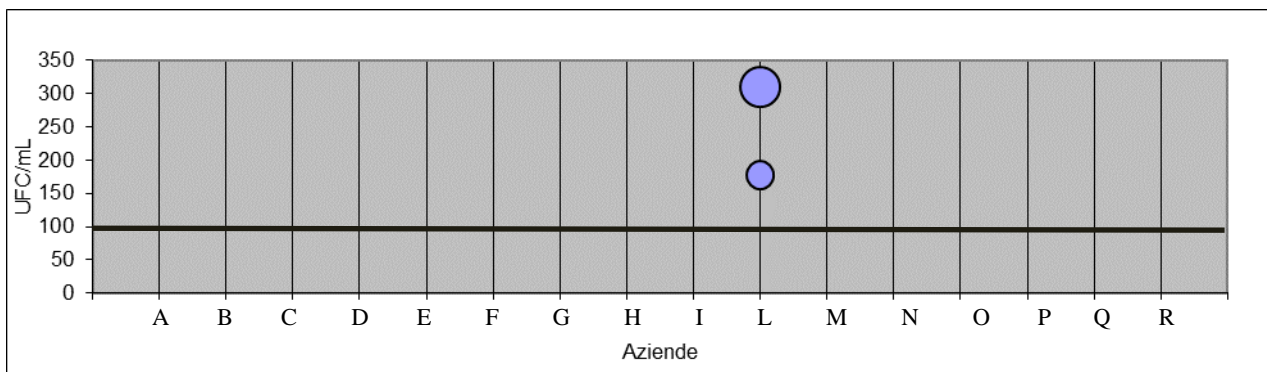


Figura 12. Ogni bolla rappresenta la numerosità del medesimo valore riscontrato, per il totale dei campioni di ogni azienda

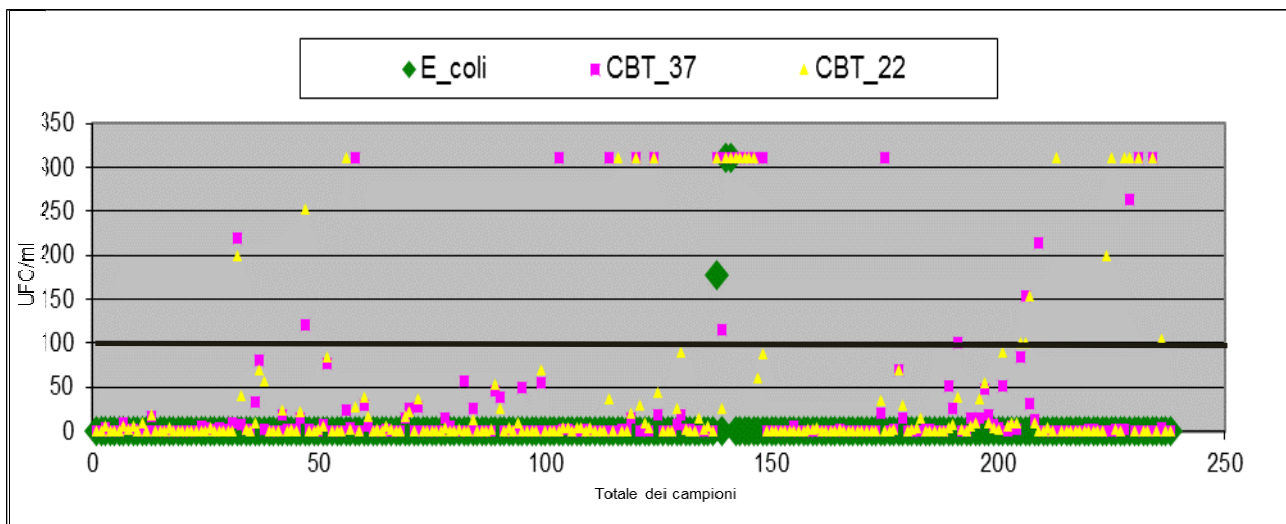


Figura 13. Valori di Staphylococcus spp. confrontati con la CBT a 22° C e a 37° C, in ogni punto di prelievo a parità di sito e di data di campionamento

Raccomandazione 10 - Salmonella spp.

Il genere Salmonella comprende microrganismi bastoncellari appartenenti alla famiglia dell'Enterobacteriaceae, gram negativi, generalmente mobili con flagelli peritrichi, anaerobi facoltativi (Popoff *et al*, 2005). Sono classificate in base ai caratteri sierologici che le differenziano in circa 2.000 tra tipi e sierotipi, raggruppate in base alla presenza di antigeni somatici (O) e flagellari (H). Le Salmonelle sono ubiquitarie nell'ambiente e sopravvivono in ambienti umidi e in stato congelato anche per parecchi mesi. Parassitano l'intestino dell'uomo, degli animali domestici e selvatici. Alcune specie possono penetrare nell'epitelio intestinale, anche se solo *S. typhi* è sistematicamente invasiva. *S. typhi* e *S. paratyphi* A infettano esclusivamente l'uomo e si trasmettono per via fecale-orale. Le altre Salmonelle sono principalmente patogene per gli animali (soprattutto pollame, bovini, suini, ovini) e infettano l'uomo per ingestione di alimenti, acqua o latte (e derivati) contaminati con feci umane o animali (meno importante il contributo della trasmissione interumana).

Le principali cause di epidemie di Salmonella sono legate alla contaminazione fecale di acque sotterranee o di superficie oppure all'inadeguato trattamento e disinfezione dell'acqua destinata al consumo umano. Poche cellule di *S. typhi* possono causare un'epidemia, mentre per gli altri sierotipi di Salmonella sono necessarie milioni di cellule per causare una gastroenterite.

RACCOMANDAZIONE 10

È consigliabile eseguire l'analisi per la ricerca della Salmonella spp. in seguito a deviazione che potrebbero coinvolgere gli impianti di trattamento o la loro gestione

*Forza della raccomandazione C
Livello di Prova I*

Nello specifico, la forza della raccomandazione (C) è determinata dall'incertezza della necessità di svolgere la procedura riportata nella raccomandazione.

Il livello di prova (I) deriva da prove ottenute da analisi microbiologiche della totalità dei campioni eseguite in replicato (tre repliche) con controlli positivi e negativi.

Nello studio condotto dai risultati sperimentali si è osservata la costante assenza di *Salmonella spp.* nei siti campionati. La descrizione del metodo utilizzato per la ricerca degli *Salmonellaspp.* è riportato nell'Allegato 1.

Raccomandazione 11 - Controllo e monitoraggio

Le analisi dei campioni di acqua sono volte a rintracciare la presenza di microrganismi che sono indicatori di contaminazione microbiologica (in particolare di natura fecale) che può derivare da fenomeni naturali o da attività antropiche (fonti di inquinamento).

Per garantire la tutela della salute del consumatore è necessario eseguire il monitoraggio continuo, così come il controllo periodico, al fine di evitare rischi di natura microbiologica e correlati all'uso di acqua non conforme agli standard qualitativi necessari nella produzione. Sia per le aziende che utilizzano acqua di rete potabile che per le aziende che utilizzano acque non potabili, i controlli vanno effettuati nei tempi e nei modi stabiliti dall'autorità competente (D.Lgs.31/2001). Questo assicura l'ingresso dell'acqua in produzione con gli standard richiesti dalla norme sulle acque potabili, rendendola idonea al consumo e alla produzione. Le aziende attuano sistemi ulteriori di trattamento delle acque (come ad esempio l'osmosi) e sistemi di analisi e controllo posti lungo i tratti della rete di trasporto e di distribuzione dell'azienda.

I tempi fissati per il monitoraggio dipendono da azienda ad azienda e variano da un monitoraggio giornaliero fino ad un monitoraggio semestrale. Nella pratica, i tempi sono programmati all'interno dell'azienda a seconda delle necessità e della tipologia di dispositivo medico prodotto. Aspetti da tener presente nella programmazione della frequenza del monitoraggio sono la provenienza delle acque e l'affidabilità degli impianti. La cadenza del monitoraggio quindi è strettamente legata alla necessità delle aziende di gestire e ridurre i rischi di un potenziale scadimento della risorsa. Tuttavia, dall'esperienza sperimentale, in alcune tipologie produttive, è utile programmare per il parametro *Pseudomonas spp.*, e non per tutto il panel di indicatori, una frequenza di almeno 15 giorni.

RACCOMANDAZIONE 11

È necessario eseguire l'analisi di Pseudomonas spp. almeno ogni 15 giorni

*Forza della raccomandazione A
Livello di Prova III*

Nello specifico, la forza della raccomandazione (A) è determinata dall'importanza di valutare la presenza dell'indicatore in esame al fine di garantire una qualità dell'acqua compatibile con le specifiche richieste.

Il livello di prova (III) deriva dall'applicazione costante delle buone pratiche di produzione data la necessità tecnica di pretrattare l'acqua in ingresso ai sistemi di purificazione e dall'esperienza del panel degli esperti.

Le aziende che hanno *Pseudomonas spp.* tra i parametri considerati nel monitoraggio campionano giornalmente a rotazione in siti diversi distribuiti lungo l'impianto e lo stesso sito è monitorato con cadenza settimanale. L'applicazione di questa raccomandazione nasce quindi dall'esperienza delle aziende coinvolte e dalla letteratura scientifica in cui è evidente il possibile ritrovamento in rete di *Pseudomonas spp.* dopo 15 giorni.

Raccomandazione 12 - Sanificazione

Questo paragrafo è strettamente connesso al precedente poiché, al di là della raccomandazione che segue, ogni azienda deve cogliere, nei risultati del monitoraggio, gli eventuali segnali di allerta e quindi procedere a una sanificazione dell'impianto.

Tuttavia in condizioni di routine si potrebbe utilizzare la raccomandazione che segue:

RACCOMANDAZIONE 12

È necessario eseguire la sanificazione degli impianti almeno una volta ogni sei mesi

*Forza della raccomandazione **B**
Livello di Prova **III***

Nello specifico, la forza della raccomandazione (B) è determinata dal dubbio sulla necessità di applicare la procedura, pur rimanendo fondamentale tenere in debita considerazione l'eventuale applicazione della stessa.

Il livello di prova (III) deriva dall'applicazione costante delle buone pratiche di produzione data la necessità tecnica di pretrattare l'acqua in ingresso ai sistemi di purificazione e dall'esperienza del panel degli esperti.

Dallo studio si è evidenziato che il 44% delle aziende svolge una sanificazione semestrale, il 12% settimanale, il 6% mensile, il 19% trimestrale e il 19% annuale (Fig. 14).

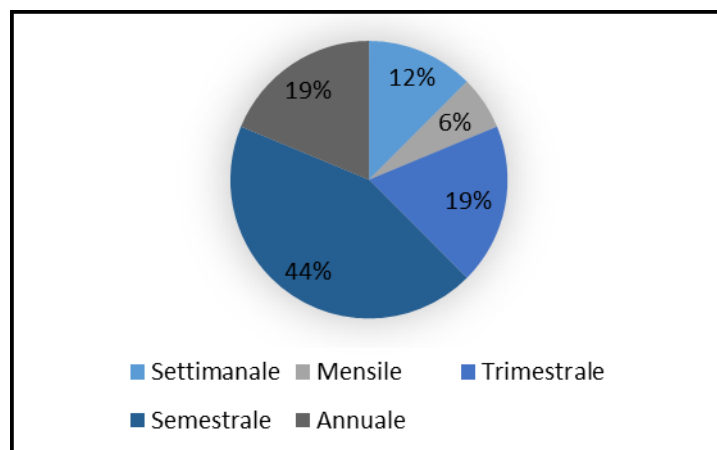


Figura 14. Distribuzione percentuale delle aziende in base alla periodicità della sanificazione

La sanificazione è condotta con prodotti specifici nel 50% dei casi e con vapore o acqua calda nell'altro 50%.

La scelta è strettamente collegata alla tipologia di produzione dei dispositivi medici, ma prevedere almeno a una sanificazione semestrale potrebbe essere di garanzia anche per le aziende che attuano una sanificazione annuale.

BIBLIOGRAFIA

APHA (American Public Health Association) American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition, Washington DC, 2005

Allen M, Edberg S, Reasoner D. Heterotrophic plate count (HPC) bacteria – What is their significance in drinking water? In: *Proceedings of the NFS International/WHO Symposium on Bacteria in drinking water. Public health implications?* Geneva, 24-27 aprile 2002. Geneva: OMS; 2003, 29-33

ANPA (Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente). Primo rapporto SINAnet sulle acque. 2011

APAT/IRSA-CNR (Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i servizi Tecnici/Istituto di Ricerca sulle Acque - Consiglio Nazionale delle Ricerche). Metodi analitici per le acque. 29/2003

Barletta F. Status of USP Monographs for Purified Water and Water for Injection. *American Pharmaceutical Review*. Spring 2002/B, 16-19

Beaton, E. Understanding MIC in Process Water Systems: Recent Findings On Its Control. *Corrosion*, 2007

Branda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005, 13:20–26

Costerton J, Lewandowski Z, Caldwell D, Korber D, Lappin-Scott H. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995, 49:711–745

Decreto Legislativo n. 46 - 24 febbraio 1997

Attuazione della direttiva 93/42/CEE concernente i dispositivi medici (integrati e modificati dalla Direttiva 2007/47/CE recepita dal D.Lgs. n. 37 del 25.01.2010)

Decreto Legislativo n. 31 – 2 febbraio 2001

Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano

Demadis KD, Mavredaki E, Stathoulopoulou A, Neofotistou E, Mantzaridis C. Industrial water systems: problems, challenges and solutions for the process industries. *Desalination* 2007, 213 (1-3), 38-46

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002, 8(9):881-90

Dworak T, Berglund M, Laaser C, Strosser P, Roussard J, Grandmougin B, Kossida M, Kyriazopoulou I, Berbel J, Kolberg S, Rodríguez-Díaz JA, Montesinos P. EU Water saving potential (Part 1 – Report). Ecologic - Institute for International and European Environmental Policy, 2007

EMA (European Medicines Agency). Note for guidance on quality of water for pharmaceutical use. CPMP/QWP/158/01 Revision EMEA/CVMP/115/01. London, 2002

EU. Comunicazione della commissione al Parlamento europeo, al Consiglio, al Comitato economico e sociale europeo e al Comitato delle Regioni. – Tabella di marcia verso un’Europa efficiente nell’impiego delle risorse. 2011. COM (2011) 571; SEC (2011) 1067; SEC (2011) 1068

European Pharmacopoeia 8th edition, 2014

Faggiano F, Gelormino E, Mathis F et al., Cessazione del fumo di tabacco. Linee Guida clinico-organizzative per la Regione Piemonte. Commissione Regionale Anti-tabacco. Quaderno n. 3, maggio 2007

Farmacopea Ufficiale Della Repubblica Italiana XII Edizione, 2008

Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010, 8: 623–633

Garrity GM, Bell, JA, Lilburn T. Family I. *Pseudomonadaceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2 (*The Proteobacteria*), part B (*The Gammaproteobacteria*), 323. Edited by Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. Springer, New York, 2005

Geldreich EE. Microbial quality of water supply in distribution systems. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1996

Hamanaka D, Onishi M, Genkawa T, Tanaka F, Uchino T. Effects of temperature and nutrient concentration on the structural characteristics and removal of vegetable-associated *Pseudomonas* biofilm. *Food Control*. 2012, 165-170

Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010, 35:322–332

ISO 6579:2002/Amd 1:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage

ISO 16266:2006. Water quality -- Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* -- Method by membrane filtration

ISPE (International Society for Pharmaceutical Engineering) Baseline. Pharmaceutical Engineering Guide, Vol. 4, “Water and Steam Systems”. First Edition, January 2001

Javaherdashti R. Microbiologically influenced corrosion-an engineering insight”, Springer-Verlag, UK, 2008

Javaherdashti R. Impact of Sulphate reducing Bacteria on the Performance of Engineering Materials, *Appl Microbiol Biot*, Springer, Germany, 2011

Kudernatsch H. Water for pharmaceutical use as a critical raw material for pharmaceutical purpose. *Pharm. Ind.* 2002, 64-8a, 856-862

Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol* 1998, 42, 9-27

Murphy MK, Black NA, Lamping DL, McKee CM, Sanderson CF, Askham J, Marteau T. Consensus development methods, and their use in clinical guideline development. *Health Technol Assess* 1998, 2(3): i-iv, 1-88.

Palleroni NJ. Genus I. *Pseudomonas*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2 (*The Proteobacteria*), part B (*The Gammaproteobacteria*), pp. 323-379. Edited by Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. Springer, New York, 2005

Popoff MY, Le Minor LE. Le Minor Formules Antigeniques des Serovars de Salmonella. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, 2001

Popoff MY, Le Minor LE. Genus XXXIII. *Salmonella*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2 (*The Proteobacteria*), part B (*The Gammaproteobacteria*), pp. 764-799. Edited by Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. Springer, New York, 2005

Rodney M. Donlan and J. William Costerton. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002, 15(2): 167–193

Santoro MP, Maini C. Which water for pharmaceutical use? *Eur J Parenter Sci* 2003, 8(1): 15-20.

Scheutz F, Strockbine NA. Genus I. *Escherichia*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed, vol. 3 (*The Firmicutes*), pp. 607-624. Edited by Vos P, Garrity GM, Jones, D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitmann W. Springer, New York, 2009

Schleifer KH, Bell JA. Genus I. *Staphylococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed, vol. 3 (*The Firmicutes*), pp. 392-421. Edited by Vos P, Garrity GM, Jones, D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitmann W. Springer, New York, 2009

SNLG (Sistema nazionale per le linee guida) Come produrre, diffondere e aggiornare linee guida per la salute pubblica. Manuale metodologico. Istituto Superiore di Sanità, 2011.

Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol* 2008, 57:966–973

Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 2001, 147:3–9

Švec P, Devriese L. Genus I. *Enterococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed, vol. 3 (*The Firmicutes*), pp. 594-607. Edited by Vos P, Garrity GM, Jones, D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitmann W. Springer, New York, 2009

UNI EN ISO 5667-3:1998. Qualità dell'acqua - Campionamento - Guida per la conservazione ed il maneggiamento di campioni

UNI EN ISO 5667-1:2007. Qualità dell'acqua - Campionamento - Parte 1: Linee guida per la definizione dei programmi e delle tecniche di campionamento

UNI EN ISO 19458:2006. Qualità dell'acqua - Campionamento per analisi microbiologiche

UNI EN ISO 5667-3:2004. Qualità dell'acqua - Campionamento - Parte 3: Guida per la conservazione ed il maneggiamento di campioni d'acqua

UNI EN ISO 7899-2:2003. Ricerca ed enumerazione di Enterococchi intestinali. Metodo di Filtrazione su membrana

UNI EN ISO 9308-1:2002. Ricerca ed enumerazione di *E. coli* e batteri coliformi. Metodo di Filtrazione su membrana

UNI EN ISO 6222:2001. Qualità dell'acqua - Valutazione quantitativa dei microrganismi vitali. Conteggio delle colonie per inoculo su terreno agarizzato

US EPA (United States Environmental Protection Agency). Method 1600: membrane filter test method for enterococci in water. 2002. EPA-821-R-02-022

United States Pharmacopeia (USP) Twenty-fifth Revision (2002), U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD

Whiteley M, Banger MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, Greenberg EP. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 2001, 413:860–864

WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*

Volk CJ, LeChevallier MW. Impacts of the reduction of nutrient levels on bacterial water quality in distribution systems. *Appl Environ Microbiol.* 1999, 65: 4957-4966

Zrelli K, Galy O, Latour-Lambert P, Kirwan L, Ghigo JM, Beloin C, Henry N. Bacterial biofilm mechanical properties persist upon antibiotic treatment and survive cell death. *New J Phys* 2013, 15, 125026 (17 pp)

GLOSSARIO

DEVIAZIONE: scostamento temporaneo di un prodotto o di un processo da uno standard di qualità previsto ed approvato

DISPOSITIVO MEDICO: qualunque strumento, apparecchio, impianto, software, sostanza o altro prodotto, utilizzato da solo o in combinazione, compreso il software destinato dal fabbricante ad essere impiegato specificamente con finalità diagnostiche o terapeutiche e necessario al corretto funzionamento del dispositivo, destinato dal fabbricante ad essere impiegato sull'uomo a fini di diagnosi, prevenzione, controllo, terapia o attenuazione di una malattia; di diagnosi, controllo, terapia, attenuazione o compensazione di una ferita o di un handicap; di studio, sostituzione o modifica dell'anatomia o di un processo fisiologico; di intervento sul concepimento, il quale prodotto non eserciti l'azione principale, nel o sul corpo umano, cui è destinato, con mezzi farmacologici o immunologici né mediante processo metabolico ma la cui funzione possa essere coadiuvata da tali mezzi. (Direttiva 93/42/CEE e successive modifiche ed integrazioni)

ISO (International Organization for Standardization): associazione non governativa indipendente che identifica quali Standard Internazionali sono richiesti da parte delle imprese, governi e società, e li sviluppa in partnership con i settori che li utilizzerà, li adotta con procedure trasparenti in base all'input nazionale e li consegna affinché siano attuate a livello mondiale

UNI (Ente Nazionale Italiano di Unificazione): associazione privata senza scopo di lucro fondata nel 1921 e riconosciuta dallo Stato e dall'Unione Europea (Elenco degli organismi nazionali di normazione ai sensi dell'articolo 27 del regolamento (UE) n. 1025/2012), che studia, elabora, approva e pubblica le norme tecniche volontarie - le cosiddette "norme UNI" - in tutti i settori industriali, commerciali e del terziario (tranne in quelli elettrico ed elettrotecnico)

UFC (Unità Formanti Colonia): numero delle cellule vitali, cioè capaci di riprodursi e quindi formare colonie, per unità di volume analizzato

Allegato 1

	Metodo di analisi	Riferimenti normativi	Quantità di campione da analizzare	Fase di filtrazione	Fase di isolamento	Espressione dei risultati	Conservazione dei campioni
Conta batterica Totale (CBT) a 22° C e a 37° C	Metodo di inclusione	UNI EN ISO 6222:2001; Allen <i>et al</i> , 2003	1 mL	//	Semina su terreno selettivo: Plate Count Agar (PCA) 22° ± 1° C per 64 - 72 ore e 37° ± 1° C per 40 - 48 ore. L'incubazione a 22°±1° C per acque molto pulite, fino a 120-144 ore.	Dopo l'incubazione contare tutte le colonie, per ciascuna temperatura, con un sistema di ingrandimento su sfondo scuro e scartare quelle a crescita confluyente. N/mL	
<i>Pseudomonas spp.</i>	Membrane Filtranti	ISO 16266:2006	250mL	250 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtri di nitrocellulosa 0,45 µm	Semina su terreno selettivo Cedrimide agar – (CN) 42° ± 1° C per 48 ore Ogni filtro è posto su piastra petri che contiene il terreno selettivo	Dopo l'incubazione, contare tutte le colonie caratterizzate da una colorazione giallo-verde UFC/mL	Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche (-20° C)
<i>Staphylococcus spp.</i>	Membrane Filtranti	US EPA Method 1600:2002	250mL	250 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtri 0,45 µm di nitrocellulosa	Semina terreno selettivo Agar Baird Parker (BP Agar) 37° ± 1° C per 48 ore	Dopo l'incubazione, contare tutte le colonie caratterizzate da una colorazione nerastra, tenendo conto della suddivisione delle colonie nere con e senza alone UFC/mL	Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche (-20° C)
<i>Escherichia coli</i>	Membrane Filtranti	UNI EN ISO 9308-1:2002; APHA, 2005	100 mL	100 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtri 0,45 µm di nitrocellulosa	Semina terreno selettivo Tryptone, Bile salts, agar, X-Glu (TBX) 44° ± 1° C per 18 ÷ 24 ore	Dopo l'incubazione, contare tutte le colonie caratterizzate da una colorazione blu-verde UFC/100mL La colorazione delle colonie è dovuta alla capacità enzimatica di <i>E. coli</i> , avviene una reazione idrolitica ad opera dell'enzima	Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche (-20° C)

						β -glucuronidasi e del cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D glucuronide (X-Gluc) presente nel terreno.	
Enterococchi intestinali	Membrane Filtranti	UNI EN ISO 7899-2:2003; APHA, 2005	100 mL	100 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtri 0,45 μ m di nitrocellulosa	Semina terreno selettivo Slanetz e Bartley (SB) 37° \pm 1° C per 44 \pm 4 ore	Dopo l'incubazione, contare tutte le colonie caratterizzate da una colorazione rosso-marrone UFC/100 mL La colorazione rosso scuro è dovuta alla riduzione del 2,3,5 Triphenyl, Tetrazolium Chloride.	Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche (-20° C)
				Fase di pre-arricchimento e arricchimento			
<i>Salmonella spp.</i>	L'isolamento ottimale di Salmonella si ottiene con un pre arricchimento seguito da un arricchimento e semina su terreno selettivo.	ISO 6579:2002/Amd 1:2007; Popoff e Le Minor, 2001; APHA, 2005	1L	Rivitalizzazione dei microrganismi in un idoneo brodo di coltura non selettivo. Acqua peptonata 36° \pm 1° C per 16÷22 ore Fase Arricchimento: Rappaport Vassiliadis brodo 42° \pm 1° C per 18÷24 ore	Semina terreno selettivo McConkey 36° \pm 1° C per 18 ÷ 24 ore	Presenza/Assenza	Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche (-20° C)