

VALIDAZIONE DI PROGRAMMI DI LAVAGGIO AI SENSI DELLA NORMA UNI EN ISO 14698-1:2004

CLIENTE: **REKEEP S.p.A.** Via Ubaldo Poli, 4 - 40069 Zola Predosa (BO)

IMPIANTO: **Ospedale San Bortolo – Via Rodolfi 37, Vicenza – Locale lavanderia**

Responsabile tecnico dello studio: D.ssa Alda Pauletto

1. GENERALITA' DELLE PROVE

Il presente documento si riferisce alle prove di validazione dei programmi di lavaggio eseguite con lavatrici MIELE PW 6161 EL con capacità di carico di Kg 16.

Le prove, svolte presso il locale lavanderia dell'ospedale di Vicenza sono riferite al programma di lavaggio applicabile alle relative tipologie di tessuto, con gli agenti di disinfezione, sul macchinario in oggetto.

Lo scopo è la validazione del programma di lavaggio ai sensi della norma UNI EN ISO 14698-1:2004 (verifica dell'efficacia battericida, fungicida, sporicida del processo, secondo i requisiti stabiliti).

Data inizio delle prove 20/01/2021

Data fine prove 12/02/2021

Norma di riferimento UNI EN ISO 14698-1:2004

Il ciclo di lavaggio validato è riassunto nelle indicazioni sottostanti:

Programma di lavaggio: **Chem Sutter/Miele a 60 °C** con centrifuga preliminare, bagno di pre-risciacquo, lavaggio principale a 60 °C, n.3 risciacqui, centrifuga finale.

Detergenti / sanificanti:

- **SUTTER CLEAN ACTIVE** Dosaggio impostato del prodotto: 8 g/Kg di materiale lavato;
- **SUTTER ALKA POWER** Dosaggio impostato del prodotto: 8 g/Kg di materiale lavato;
- **SUTTER PERACTIVE** Dosaggio impostato del prodotto: 6 g/Kg di materiale lavato con 20 minuti di mantenimento.

1.1. METODO DI PROVA-PRINCIPIO

La validazione prevede l'uso di provini dello stesso materiale tessibile del medesimo tipo di quelli sottoposti al processo di lavaggio. Tali provini sono contaminati con microrganismi noti in una quantità misurata.

I provini sono quindi sottoposti al processo di lavaggio che deve essere validato. È controllata la capacità del processo di ridurre ad un fattore di 10^5 il numero dei batteri e di 10^4 il numero dei lieviti e delle spore fungine.

Sono eseguiti i seguenti controlli:

CONTROLLO A

Conte delle unità vitali (riportate come ufc sui rapporti di prova) nella sospensione iniziale dei microrganismi. Il controllo A è progettato per dimostrare che i numeri iniziali di microrganismi sono sufficientemente alti da consentire la misurazione della riduzione desiderata della popolazione di microrganismi.

CONTROLLO B

Conta delle unità vitali sui provini di controllo sottoposti esattamente alla stessa procedura del provino ad eccezione del processo di lavaggio. Il controllo B è progettato per dimostrare che la vitalità dei microrganismi non cambia durante il periodo di validazione.

CONTROLLO C

Conta delle unità vitali sui provini di controllo sottoposti esattamente allo stesso procedimento del provino ma contaminati con la sospensione di microrganismi solo dopo il processo di lavaggio. Il controllo C è progettato per dimostrare che la tecnica di conta degli organismi sopravvissuti è appropriato alle condizioni del processo (tempo, effetto meccanico, temperatura, presenza di residui dei prodotti di lavaggio sui materiali tessili, ecc.)

Per la correttezza della prova è preparata una sospensione di microrganismi noti in una soluzione proteica. Ai provini è applicato un volume noto della sospensione. I provini sono sottoposti al processo di lavaggio come parte di un normale carico simulato di materiali tessili. La conta dei microrganismi sui provini è effettuata dopo il processo di lavaggio. La riduzione della popolazione di microrganismi è misurata e confrontata con i valori sopra menzionati.

È essenziale che i tessuti utilizzati nel carico normale simulato siano sterilizzati prima del loro riutilizzo oppure distrutti. Nel caso specifico il carico normale simulato è costituito da materiale che verrà distrutto al termine di ogni ciclo di lavaggio.

2. MICRORGANISMI E SOSPENSIONI MICROBICHE

Batteri	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536) <i>Enterococcus hirae</i> (ATCC 10541) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)
Miceti	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9084) <i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)
Spore batteriche	<i>Bacillus subtilis var. niger</i> (ATCC 6633) <i>Clostridium sporogenes</i> (ATCC 19404)
Terreno di sospensione	
Batteri	<i>Soluzione salina peptonata sterile</i>
Miceti	<i>Soluzione salina peptonata sterile con aggiunta di 0.05% di polisorbato 80 (Tween 80)</i>
Spore batteriche	<i>Acqua distillata sterile</i>
Soluzione proteica	Soluzione proteica di albumina bovina sterile al 3% miscelata con estratto di lievito sterile in polvere al 15%, in rapporto 20:100
Terreno di recupero	Acqua distillata sterile
Controlli e provini	I provini, realizzati in materiale tessile hanno dimensioni circa di 10x5 cm, e sono di materiale simile al tessuto sottoposto al trattamento. L'area contaminata ha dimensioni 5x5 cm. Vengono avvolti in materiale permeabile al vapore e sterilizzati (procedura interna).

Preparazione dell'inoculo

Batteri	<i>Sospensione $\geq 10^8$ UFC/ml</i>
Funghi/spore batteriche	<i>Sospensione $\geq 10^7$ UFC/ml</i>

3. PROCEDIMENTO

Come previsto dalla norma UNI EN ISO 14698 si eseguono i controlli denominati A, B, C.

CONTROLLO A

Dopo opportune diluizioni della sospensione di inoculo iniziale si effettua una semina in doppio per inclusione in terreno agarizzato. La media delle due conte nella diluizione contenente da 30 a ufc/ml a 300 ufc/ml è denominata N .

Va controllato che il numero della sospensione originale sia $\geq 10^8$ / ml per cellule batteriche e $\geq 10^7$ / ml per cellule fungine o per spore batteriche.

CONTROLLO B

Partendo da diluizioni appropriate si inoculano due provini di controllo con 0,5 ml di una sospensione contenente da 30 a 300 ufc/ml e altri due provini di controllo con 0,5 ml di una sospensione contenente da 300 a 3000 ufc/ml.

Questi 4 provini di controllo sono gestiti e sottoposti a prova assieme ai provini, ad eccezione del processo di lavaggio.

I telini in laboratorio, verranno incorporati in agar nutritivo e incubati. Verranno poi contate le unità vitali (ufc).

La conta media corrispondente ai pezzi di controllo più contaminati è denominata N'_1 , l'altra N'_2 .

CONTROLLO C

Si applicano 0,5 ml di soluzione proteica ad un provino di controllo, che verrà sottoposto all'intero processo di lavaggio. Si conserva il contenitore sterile tra +1°C e +4°C mantenendo la stessa temperatura durante il trasporto fino ad arrivo presso il laboratorio.

In laboratorio:

Il provino di controllo, quindi, viene immerso in 100 ml di terreno di recupero, agitato per 15-30 secondi. Al terreno di recupero contenente il provino si aggiungono 2 ml della sospensione contenente da 30 a 300 ufc/ml.

- Il telino viene estratto con pinzetta sterile e posto in piastra Petri, provvedendo ad includerlo con quantità sufficiente di terreno agarizzato. Si procede all'incubazione a temperatura idonea in base alla tipologia e alle esigenze del microrganismo in esame. La conta ottenuta è denominata n_1 .
- Il terreno di recupero viene filtrato su membrana in grado di trattenere i microrganismi. Che viene poi trasferita su piastra Petri contenente terreno agarizzato. Si procede all'incubazione a temperatura idonea in base alla tipologia e alle esigenze del microrganismo in esame. La conta ottenuta è denominata n_2 .

- Si determina n:

$$n = (n_1 + n_2)/2$$

Se $N \sim N'_2 \sim n$, le condizioni sperimentale sono validate per la prova

3.1 PROVE

Miscelare e lasciare a contatto per 5 minuti a temperatura ambiente 3 ml della sospensione di microrganismi e 2 ml della soluzione proteica.

Applicare 0,5 ml della sospensione risultante al provino. Per ogni microrganismo sottoposto a prova contaminare 3 provini.

I provini, al termine del processo di lavaggio, vengono recuperati con strumenti sterili. Si conservano i contenitori sterili tra +1°C e +4°C mantenendo la stessa temperatura durante il trasporto fino ad arrivo presso il laboratorio.

In laboratorio:

Ogni provino è trasferito in 100 ml di terreno di recupero e agitato per 15-30 secondi.

- Il terreno di recupero contenente i provini viene filtrato, alle diluizioni opportune, attraverso membrana di nitrocellulosa. Le membrane si pongono su terreno agarizzato e si incubano. Si determina la conta n'_1
- Ogni provino si trasferisce in modo asettico su capsula di Petri, e si ricopre con terreno agarizzato. Si mette ad incubare e si determina la conta n'_2

Si calcola R (numero di microrganismi residui dopo il lavaggio):

$$R = n'_2 + n'_1$$

4. RISULTATI

Si calcola il rapporto del numero N di microrganismi applicato ai provini di controllo su R (numero di microrganismi residui dopo il lavaggio).

La validazione consiste nella dimostrazione di una riduzione di un fattore di almeno 10^5 per i batteri e di 10^4 per spore fungine e lieviti.

Determinazione del fattore di riduzione decimale (d):

$$d = N/R$$

Per agevolare la lettura dei risultati, si utilizzano i coefficienti logaritmici di riduzione decimale in forma esponenziale, riportati come:

$$d = \log N - \log R$$

log (logaritmo decimale)

N (carica iniziale dell'inoculo prima del ciclo di lavaggio)

R (numero di batteri residui dopo il ciclo)

Se con r si definisce il log del fattore di riduzione minimo necessario per la validazione (quindi $\log 10^5$ o $\log 10^4$), per l'esito positivo della validazione dovrà essere sempre verificato:

$$d > r$$

Ai fini della validazione di ogni ciclo lavaggio è necessario siano rispettate le seguenti condizioni:

Condizione 1

$$N \sim N'_2 \sim n$$

Condizione 2

Nel caso risulti:

$$N'_2 \leq 0,5 N ; N'_1 \leq 0,05 N \text{ e/o } n \leq 0,5 N$$

Allora si devono ripetere i controlli, ad esempio, utilizzando composti che neutralizzano gli agenti chimici contenuti nei provini di controllo sottoposti a lavaggio.

A fine documento si riportano in tabella le evidenze del rispetto delle condizioni di validità.

5. VERIFICA DEL RISPETTO DELLE CONDIZIONI PROPEDEUTICHE ALLA VALIDAZIONE

Progr. 60°C tessuto microfibra prodotti SUTTER					
ceppo	Valore N ufc/ml	N/2	N' ₂	N' ₁	n
<i>Enterococcus hirae</i> (ATCC 10541)	6,9 x 10 ⁸	3,5 x 10 ⁸	4,2 x 10 ⁸	3,9 x 10 ⁸	3,8 x 10 ⁸
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	6,6 x 10 ⁸	3,3 x 10 ⁸	5,1 x 10 ⁸	4,8 x 10 ⁸	4,3 x 10 ⁸
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	6,0 x 10 ⁷	3,0 x 10 ⁷	4,5 x 10 ⁷	4,6 x 10 ⁷	4,2 x 10 ⁷
<i>Bacillus subtilis var. niger</i> (ATCC 9372)	5,3 x 10 ⁷	2,7 x 10 ⁷	4,4 x 10 ⁷	4,3 x 10 ⁷	4,1 x 10 ⁷
<i>Clostridium sporogenes</i> (ATCC 19404)	4,4 x 10 ⁷	2,2 x 10 ⁷	3,7 x 10 ⁷	3,3 x 10 ⁷	3,8 x 10 ⁷
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	6,2 x 10 ⁸	3,1 x 10 ⁸	4,2 x 10 ⁸	3,9 x 10 ⁸	3,8 x 10 ⁸
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9084)	6,4 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁸	5,1 x 10 ⁸	4,8 x 10 ⁸	4,3 x 10 ⁸

Condizione di validità 1: $N \approx N'_2 \approx n$

Condizione di validità 2: $N'_2 > 0,5 N$; $N'_1 > 0,05 N$; $n > 0,5 N$

Le condizioni di validità 1 e 2 sono sempre rispettate.

6. VALUTAZIONE DEI COEFFICIENTI DI RIDUZIONE DECIMALE

Si riportano i risultati per ceppo della prova di validazione:

Progr. 60°C tessuto microfibra prodotti SUTTER				
Ceppo	Valore N ufc/ml	Valore R	d	r
<i>Enterococcus hirae</i> (ATCC 10541)	6,9 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁰	8,53	5
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	6,6 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁰	8,03	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	6,0 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁰	7,78	5
<i>Bacillus subtilis var. niger</i> (ATCC 9372)	5,3 x 10 ⁷	4,0 x 10 ¹	6,12	4
<i>Clostridium sporogenes</i> (ATCC 19404)	4,4 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁰	7,64	4
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	6,2 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁰	8,49	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9084)	6,4 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁰	8,03	5

La condizione $d > r$, necessaria per l'esito positivo della validazione dei cicli di lavaggio, è sempre rispettata.

7. CONCLUSIONI

Con i parametri riportati nel paragrafo 4, i programmi di lavaggio utilizzati in questo studio

Si considerano validati ai sensi della norma UNI EN ISO 14698-1:2004

Responsabile D.ssa Alda Pauletto

