

QUALITÀ DELLE ACQUE INDUSTRIALI UTILIZZATE NEL SETTORE DEI DISPOSITIVI MEDICI: IL PROGETTO

Laura Mancini (a), Stefania Marcheggiani (a), Anna Maria D'Angelo (a), Cinzia Grasso (a), Silvana Cacioli (a), Emilio D'Ugo (a), Massimiliano Bugarini (a), Roberto Giuseppi (a), Camilla Puccinelli (a), Filippo Chiudioni (a), Fabrizio Volpi (a), Elisabetta Volpi (a), Alessandro Pinter (a), Mario Figliomeni (a), Elio Pierdominici (a), Cinzia Ferrari (a), Cristina Romanelli (b), Maria Rosaria Lombardi (c), Giuseppina Terzulli (c), Graziella Quinci (c)
(a) Dipartimento di Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Organismo Notificato Unificato 0373, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(c) Direzione Generale dei Dispositivi Medici e del Servizio Farmaceutico, Ministero della Salute, Roma

Articolazione del progetto

Il progetto, si è articolato in diverse fasi: individuazione delle tipologie e classi dei dispositivi medici, messa a punto e applicazione di un questionario informativo e di protocolli sperimentali, organizzazione di incontri con le aziende per la presentazione del progetto.

I risultati delle analisi sperimentali hanno permesso la realizzazione e pubblicazione di una linea guida sul portale del Ministero della Salute (Mancini *et al.*, 2015) e la sua disseminazione.

Individuazione delle tipologie e classi dei dispositivi medici

Il Dipartimento Ambiente e Salute (Reparto Qualità Ambientale e Ittiocoltura) in collaborazione con l'Organismo Notificato Unificato 0373, ha selezionato le aziende da coinvolgere nello studio sulla base delle tipologie e delle classi dei dispositivi medici prodotti. Oltre alle aziende produttrici di dispositivi medici non iniettabili e prevalentemente ad uso topico, sono state selezionate anche quelle che producono tutti i dispositivi medici che prevedono l'uso di acqua sia nella produzione sia come componente, comprendendo, quando disponibili, anche i dispositivi medici iniettabili.

Le 16 ditte che hanno partecipato allo studio, sono state selezionate anche sulla base della posizione geografica, affinché questa fosse rappresentativa delle varie regioni italiane, così da contemplare eventuali variazioni dovute alle singole specificità del territorio.

Messa a punto di un questionario informativo

Le aziende selezionate producono differenti tipologie di dispositivi: medici, pomate, disinfettanti per dispositivi medici, ecc. È stato pertanto predisposto un questionario informativo volto a 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.

Come mostrato nell'Allegato A di questo capitolo, il questionario è articolato in diverse sezioni:

- Dati della ditta;
- Tipologia dei prodotti realizzati;

- Struttura degli ambienti di produzione e tipologia di acqua usata nel processo produttivo, controlli e trattamenti;
- Laboratorio;
- Riciclo acqua di processo;
- Formazione del personale;
- Manutenzione impianti;
- Verifiche ispettive;
- Eventi avversi.

Predisposizione di protocolli sperimentali per valutare la qualità microbiologica delle acque industriali

Protocollo di campionamento

Il campionamento rappresenta una fase cruciale dell'intero procedimento analitico (APAT/IRSA-CNR, 2003). Le fasi che precedono le analisi microbiologiche, cioè il campionamento, il trasporto e la conservazione del campione, sono da considerarsi parte integranti del processo poiché possono incidere sull'attendibilità e l'affidabilità dei risultati analitici; durante il prelievo, quindi, devono essere osservate le *buone pratiche di laboratorio* e le norme di settore (UNI EN ISO 19458:2006), evitando contaminazioni secondarie del campione.

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).

Si riporta di seguito il protocollo utilizzato.

Materiale necessario

Di seguito viene riportato il materiale necessario per il campionamento in sterilità, per l'etichettatura e la conservazione del campione.

1. *Etichetta/pennarello indelebile per identificare il campione.*
2. *Bottiglie sterili*
 - Bottiglie di vetro Pyrex (borosilicato), sterilizzate in laboratorio a calore secco (a circa 160°C per 60 minuti) o a calore umido (a circa 121°C per 20 minuti) in condizioni controllate.
 - Bottiglie monouso in materiale plastico (generalmente polietilene), disponibili in commercio già sterili.
3. *Flambatore per la sterilizzazione dell'ugello di prelievo*

Ove possibile, sterilizzare la bocca d'uscita del getto del campione.
Per la produzione della fiamma utilizzare gas propano o butano che permettono sia di raggiungere temperature più elevate sia di controllare la fiamma.
4. Frigo portatile per il mantenimento della temperatura.
5. Parafilm per la chiusura dei tappi

Prelievo per analisi microbiologiche

I volumi di acqua da prelevare vanno definiti in funzione dei parametri richiesti e devono essere superiori al minimo necessario per lo svolgimento delle analisi. Nella Tabella 1 sono riportate le quantità di campione necessarie per le singole analisi.

Tabella 1. Quantità di campione necessarie per le singole analisi

Microrganismo	Quantità di acqua da analizzare
CBT a 22°C	1 mL
CBT a 37°C	1 mL
<i>Escherichia coli</i>	100 mL
Enterococchi intestinali	100 mL
<i>Pseudomonas</i> spp.	250 mL
<i>Salmonella</i> spp.	1000 mL
<i>Staphylococcus</i> spp.	250 mL

CBT: Conta Batterica Totale

A seconda che il prelievo fosse effettuato dal rubinetto o da un pozzo o serbatoio, sono stati seguiti due protocolli:

– *Prelievo da un rubinetto*

Prima di effettuare il prelievo è necessario asportare, se presenti, tubi e guarnizioni in plastica e gomma. Nel caso di rubinetti metallici, è opportuno flambarne la bocca. Il flambaggio, tuttavia, se effettuato in modo superficiale, non esplica alcun effetto sull'eventuale presenza di contaminazione batterica.

Aprire il rubinetto e lasciare scorrere l'acqua per 3-5 minuti; i rubinetti, infatti, devono essere detersi per eliminare depositi, mucillagini, sostanze grasse o agenti disinfettanti che possono influenzare i risultati delle analisi microbiologiche. Il collo all'interno del rubinetto può essere sede di biofilm che, per quanto possibile, va eliminato.

Durante il prelievo devono essere osservate le buone pratiche, evitando che vi sia contaminazione secondaria del campione. Di conseguenza è necessario aprire la bottiglia sterile al momento del prelievo, tenendola dalla base, avendo cura di non toccare la parte interna del collo della bottiglia né la parte interna del tappo; il contenitore va riempito, senza modificare il flusso del rubinetto durante il prelievo. Le bottiglie e i contenitori utilizzati per prelevare campioni per analisi microbiologiche non devono mai essere sciacquati all'atto del prelievo in quanto il risciacquo espone i recipienti a possibili contaminazioni. Per consentire una efficace omogeneizzazione del campione al momento dell'analisi, è importante evitare di riempire completamente il contenitore. Si dovrebbe infatti lasciare uno spazio di circa 2,5 cm sotto il dispositivo di chiusura. Al termine del prelievo è importante chiudere immediatamente il tappo del contenitore e identificare il campione con un numero di riferimento o con i dati necessari per l'identificazione. Infine è necessario porre il campione alla temperatura di +4°C fino al momento dell'esecuzione delle analisi.

– *Prelievo da pozzo o serbatoio*

Nel corso dei prelievi di campioni di acqua ad uso industriale eseguiti nell'ambito del progetto, ci si è trovati a dover eseguire campionamenti direttamente da serbatoi. In questi casi, è necessario utilizzare bottiglie sterili incartate prima della sterilizzazione in modo da non contaminare l'acqua da prelevare. Utilizzando una pinza o un altro sistema idoneo (anch'esso sterilizzato e incartato fino al momento del prelievo), calare la bottiglia nel pozzo, immergendola completamente e lasciando che si riempia. Tirata fuori, è importante scartare i primi 2-3 cm di acqua per creare una efficace omogeneizzazione del campione al momento dell'analisi. Chiudere immediatamente il tappo della bottiglia e identificare il campione con un numero di riferimento o con i dati del campione necessari all'identificazione.

Le fasi successive ricalcano fedelmente quanto già indicato per i prelievi da rubinetto.

Etichettatura e identificazione campioni

Ogni campione deve essere facilmente identificabile fino al termine dell'analisi utilizzando un'etichetta applicata solidamente o, in alternativa, pennarelli indelebili. Se si utilizzano cartellini legati con un laccio, gli occhielli devono essere rinforzati. Un esempio di codifica campione è riportato nella Figura 1.

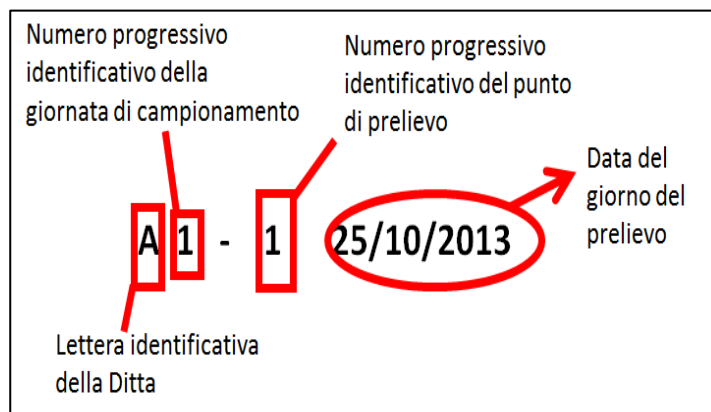


Figura 1. Esempio di codifica campione

La documentazione che accompagna il campione va messa in busta separata preferibilmente di plastica. È responsabilità del campionatore annotare tutti i dati di campionamento necessari sul modulo predisposto o sul registro.

I moduli compilati vanno archiviati.

Trasporto dei campioni

Durante il trasporto il campione deve essere mantenuto a +4°C.

Come ulteriore forma di protezione, il trasporto in laboratorio dei campioni dovrebbe essere fatto in contenitori secondari di metallo o di plastica, autoclavabili e resistenti ai disinfettanti chimici.

Spedizione

Mettere la bottiglia con il campione in una scatola di cartone robusto con un imballaggio sufficiente a garantire che non si danneggi durante la spedizione. Il vuoto lasciato nel collo della bottiglia compenserà l'eventuale espansione del liquido durante il trasporto. Mettere le bottiglie in una busta di plastica e sigillarla con una fascetta o con del nastro isolante. In questo modo, se si verificano perdite durante il trasporto, l'acqua non indebolirà l'imballaggio in cartone.

Compilare un foglio dati per ogni campione con i documenti necessari per l'identificazione e le successive analisi microbiologiche.

Inviare i campioni e i fogli dati a mezzo corriere o posta con numero di tracciamento. È utile comunicare per e-mail il nome del corriere e il numero di tracciamento, se si desidera che lo stato di spedizione del pacco sia monitorato. Al ricevimento dei campioni presso il laboratorio, con una e-mail o fax informare dell'arrivo dei campioni e del loro stato.

Ricezione di pacchi e loro apertura

Se le quantità dei campioni che si ricevono lo giustifica, sarebbe opportuno adibire una zona specifica per la loro ricezione.

I campioni devono essere aperti da personale informato delle procedure.
Gli involucri esterni dei campioni andrebbero comunque aperti su vassoi.

Registrazione e archiviazione

Sarà cura del personale addetto alle analisi, una volta arrivati in laboratorio, conservare i campioni in un frigorifero a temperatura controllata di +4°C. Il tempo che deve intercorrere tra il campionamento e le analisi microbiologiche non deve superare le 24 h; di norma si raccomanda di analizzare i campioni il giorno stesso del ricevimento in laboratorio (UNI EN ISO 5667-3, 1998).

In laboratorio registrare su apposito registro o su supporto informatico i dati identificativi del campione già precedentemente indicati, aggiungendo i seguenti:

- numero progressivo e data di registrazione;
- giorno e ora di ricevimento in laboratorio;
- modalità di conservazione nel trasporto;
- parametri da analizzare.

Protocolli per le analisi microbiologiche

Per le analisi microbiologiche è stato utilizzato un set di microrganismi patogeni e indicatori che rappresentano un possibile rischio per la salute umana, quali Conta Batterica Totale (CBT) a 22°C e a 37°C, *Pseudomonas* spp. (Garrity *et al.*, 2005; Palleroni, 2005; ISO, 2006), *Staphylococcus* spp. (Schleifer & Bell, 2009), *Salmonella* spp. (Popoff *et al.*, 2005; Popoff, 2001), *Escherichia coli* (Scheutz & Strockbine, 2009), Enterococchi intestinali (Švec & Devriese, 2009).

In Allegato A2 di questo capitolo sono riportati gli schemi dei protocolli utilizzati per la determinazione dei microrganismi.

Incontri con le aziende

In ogni azienda sono stati programmati un primo incontro per presentare lo scopo del progetto di ricerca e una serie di sopralluoghi successivi per poter svolgere i campionamenti necessari per le analisi di laboratorio.

In particolare, durante il primo incontro in ogni azienda è stato compilato, insieme ai responsabili e al personale dell'azienda, il questionario informativo; visitato l'impianto e stabilito il numero dei punti di campionamento, laddove possibile, in coincidenza con i normali punti di monitoraggio dell'azienda. Data la diversità dei sistemi di trattamento e distribuzione, sono stati individuati cinque 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.

La frequenza del campionamento è stata stabilita su base mensile con non meno di 3 ripetizioni successive. Alle aziende dove non è stato possibile effettuare o partecipare a tutti i prelievi, è stato consegnato un memorandum che fosse da guida nelle fasi di campionamento.

Risultati delle attività sperimentali

Sono di seguito riportati i risultati dell'attività sperimentale; in particolare, i dati raccolti tramite il questionario informativo e i risultati delle analisi microbiologiche.

Informazioni del questionario

Vengono riportati i risultati più significativi della somministrazione del questionario alcuni anche rappresentati graficamente per una migliore comprensione..

Il questionario, compilato sulla base delle interviste rivolte ai rappresentanti delle aziende durante i sopralluoghi, è ad uso esclusivamente interno poiché contiene dati sensibili, ma ha fornito elementi utili per elaborare le raccomandazioni presentate nella linea guida (Mancini *et al.*, 2015).

Dati dell'azienda

L'88% delle aziende ha dichiarato di avere un sistema di gestione della qualità certificato, il restante, invece, non ha attività sottoposte ad un sistema di gestione della qualità..

Il 75% delle aziende ha dichiarato di applicare le *Good Manufacturing Practice* (GMP).

La distribuzione del mercato di riferimento, rappresentato in Figura 2, sembra decisamente orientato per quello italiano e europeo.

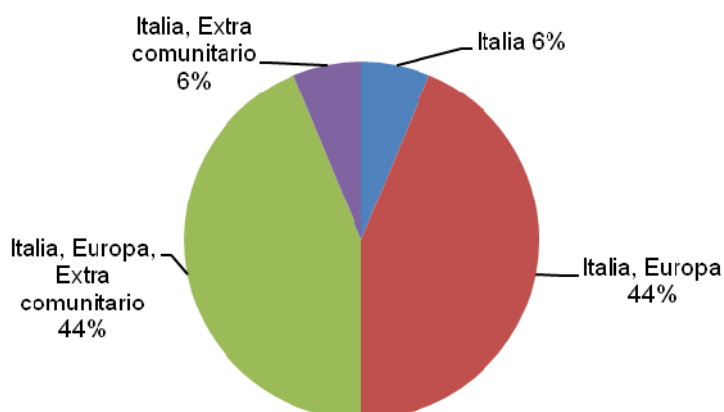


Figura 2. Mercato di riferimento commerciale delle aziende che producono dispositivi medici (fonte: aziende intervistate)

Prodotti

La distribuzione delle diverse classi di dispositivi medici prodotti dalle aziende è rappresentato in Figura 3.

La distribuzione delle diverse tipologie di dispositivi medici prodotti dalle aziende è rappresentato in Figura 4.

Il 63% delle aziende interpellate realizza cosmetici, integratori e farmaci. Il 6% delle aziende interpellate realizza biocidi.

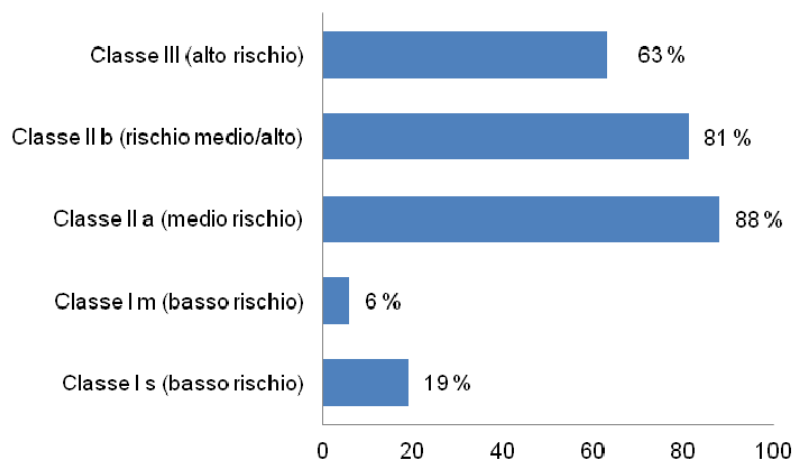


Figura 3. Classi di dispositivi medici prodotti dalle aziende che producono dispositivi medici (fonte: aziende intervistate)

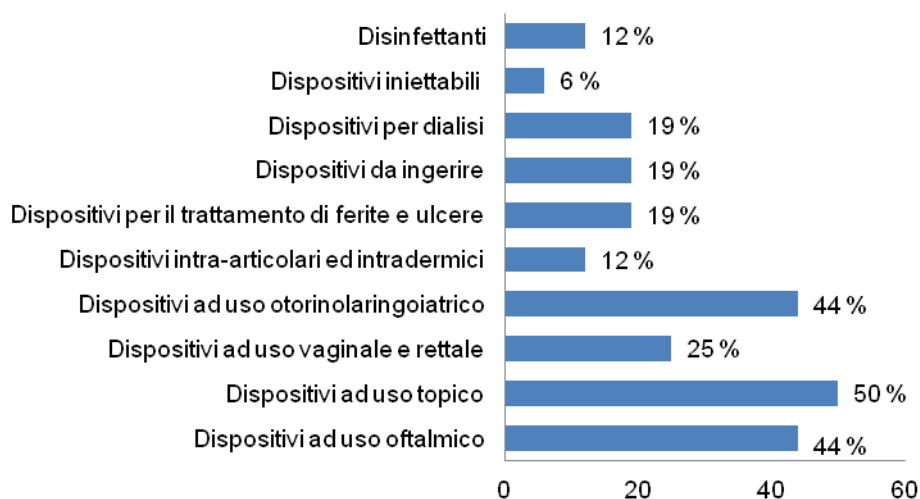


Figura 4. Tipologie di dispositivi medici prodotti dalle aziende produttrici (fonte: aziende intervistate)

Struttura

L'81% delle aziende hanno gli ambienti di produzione a contaminazione controllata. Di questi il 63% sono validati e il restante 37% non lo sono.

Produzione

L'acqua di rete è la tipologia di acqua che viene maggiormente utilizzata in ingresso al sistema di trattamento, come rappresentato in Figura 5.

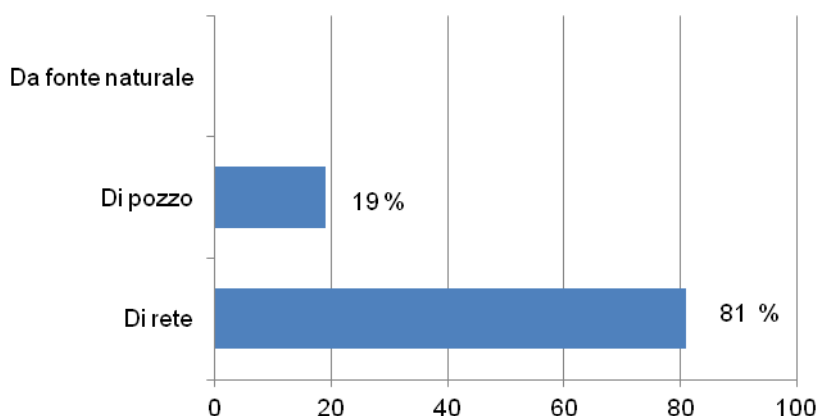


Figura 5. Ripartizione del tipo di acqua utilizzata in ingresso al sistema di trattamento dalle aziende produttrici di dispositivi medici (fonte: aziende intervistate)

L'88% delle aziende utilizza acqua potabile in ingresso, il restante 12% esegue la potabilizzazione.

Il 94% delle aziende esegue un pretrattamento (es. addolcimento, dechlorazione, filtrazione, ecc). Il 44% delle aziende esegue un trattamento per le acque per preparazioni iniettabili.

Il 94% delle aziende effettuano controlli microbiologici dell'acqua. Di questi, il 67% sono svolti internamente all'azienda, il restante 33% si affidano a laboratori esterni.

La periodicità delle attività di pulizia/sanificazione scelte dalle aziende sono riportate in Figura 6.

La modalità dell'attività di pulizia/sanificazione viene svolta per il 50% con vapore o acqua calda e il 50% con prodotti specifici.

Il 69% delle aziende durante le visite ispettive interne, prevede di esaminare anche le attività connesse al trattamento dell'acqua.

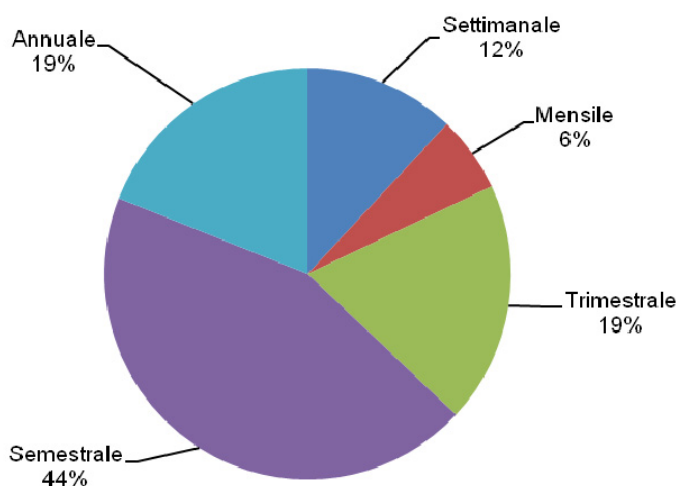


Figura 6. Periodicità delle attività di pulizia/sanificazione (fonte: aziende intervistate)

Approcci per il campionamento

Il 75% delle aziende ha dichiarato che gli operatori utilizzano i guanti durante le operazioni di prelievo.

Solo il 19% delle aziende ha dichiarato che gli operatori durante le attività di prelievo flambano l'ugello del punto di prelievo.

Solo il 12% delle aziende ha dichiarato che gli operatori utilizzano tubi di raccordo durante le attività di prelievo.

Il 94% delle aziende ha dichiarato che nelle proprie procedure di campionamento è previsto di fare scorrere l'acqua prima del prelievo.

Risultati delle analisi microbiologiche

Per ognuna delle 16 aziende, i campionamenti sono stati effettuati 1 volta al mese nei 5 punti di prelievo precedentemente stabiliti con le aziende, e ripetuti per 3 mesi; per ogni sito di prelievo, sono state condotte analisi per la ricerca di 7 parametri microbiologici, effettuando 3 repliche per ciascun parametro per un totale di 5040 analisi microbiologiche.

Per la gestione dei dati raccolti è stato creato e sviluppato un database in Microsoft Access e per l'elaborazione sono stati creati sei programmi distinti, contenenti una serie di comandi e di *query* SQL, per creare tabelle di metadati da cui estrarre le informazioni finali desiderate:

- Con il primo programma sono state create alcune tabelle di lavoro intermedie, in cui i dati sono stati riorganizzati, corretti e uniformati tramite una serie di procedure, al fine di ottenere un'unica tabella di riferimento per fare l'elaborazione dei dati.
- Il secondo programma ha creato una serie di tabelle relative alle chiavi di ricerca da utilizzare successivamente, per catalogare/filtrare i dati (es. lista delle ditte, lista dei parametri, ecc.)
- Il terzo programma ha eseguito una statistica descrittiva dei campioni rilevati, producendo varie tabelle, distinguendo i dati per ditta, prelievo, parametro, range di valori.
- Con ulteriori tre programmi sono state generate le tabelle di uscita finali per poter riassumere, e presentare anche a livello grafico, i dati dei campioni raggruppati per ditta, parametro, punto di prelievo, ecc., al fine di mostrare le distribuzioni percentuali, gli andamenti e i confronti tra coppie di parametri (Figura 7).

La Farmacopea europea fissa i limiti microbiologici per la Conta Batterica Totale (CBT) a 100 UFC/mL (Unità Formanti Colonie) per l'acqua depurata.

CBT a 22°C risulta maggiore di 100 UFC/mL nel 51% dei campioni analizzati, mentre CBT a 37°C nel 49% dei casi.

CBT come unico parametro da ricercare, anche con il limite di 100 UFC/mL, non esclude la presenza di *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. ed *Escherichia coli* (Figure 8-10).

Dei 190 campioni che presentano valori positivi per i parametri ricercati, il 2% risulta positivo per *E.coli*, il 3% per Enterococchi, il 63% per *Pseudomonas* spp. e il 32% per *Staphylococcus* spp. (Figura 11). Le analisi per *Salmonella* spp. sono sempre risultate negative.

Le Figure 12-15 rappresentano la distribuzione dei parametri ricercati nei siti campionati.

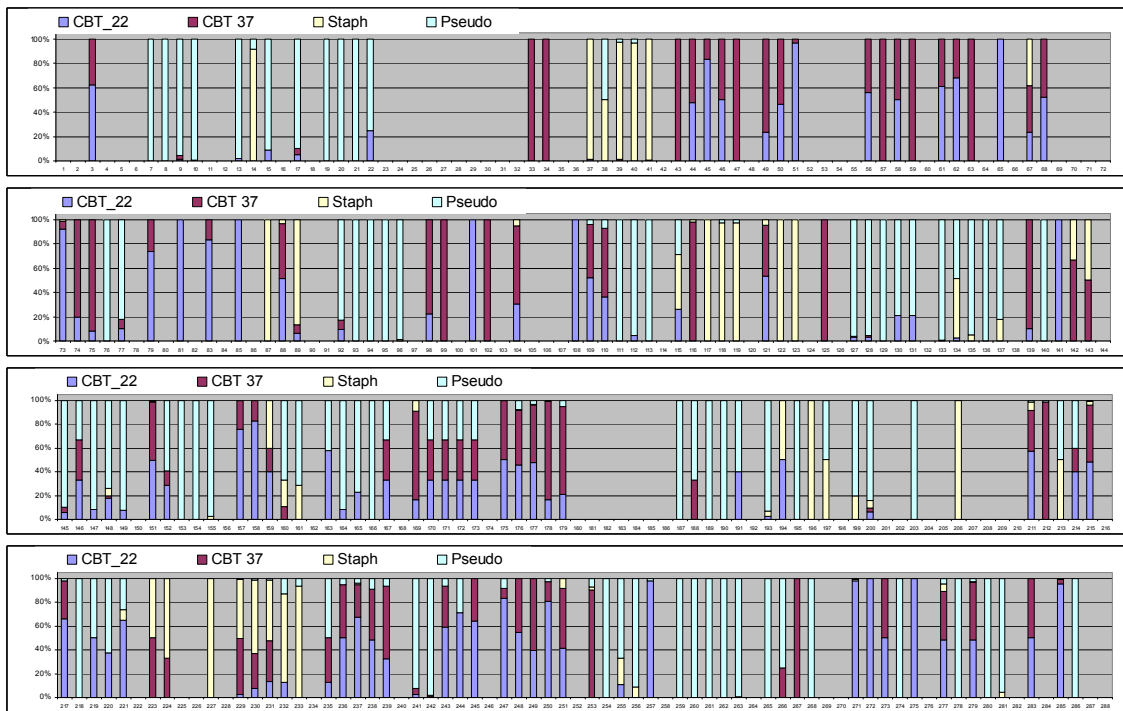


Figura 7. Confronto % tra i quattro parametri indicati, in ogni punto a parità di data di campionamento. Le ditte (A-R) sono separate dalle linee tratteggiate

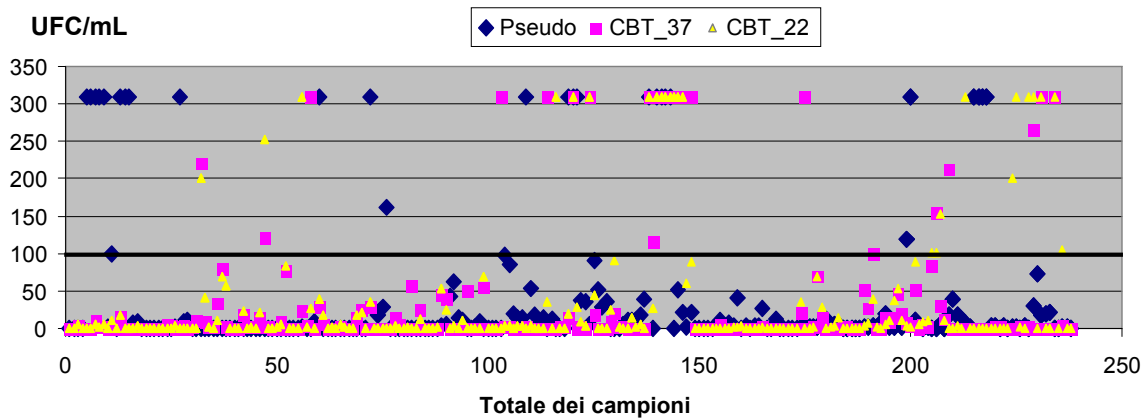


Figura 8. Valori di *Pseudomonas* spp. confrontati con la CBT a 22°C e a 37°C, per il totale dei campioni, in ogni punto di prelievo a parità di sito e di data di campionamento

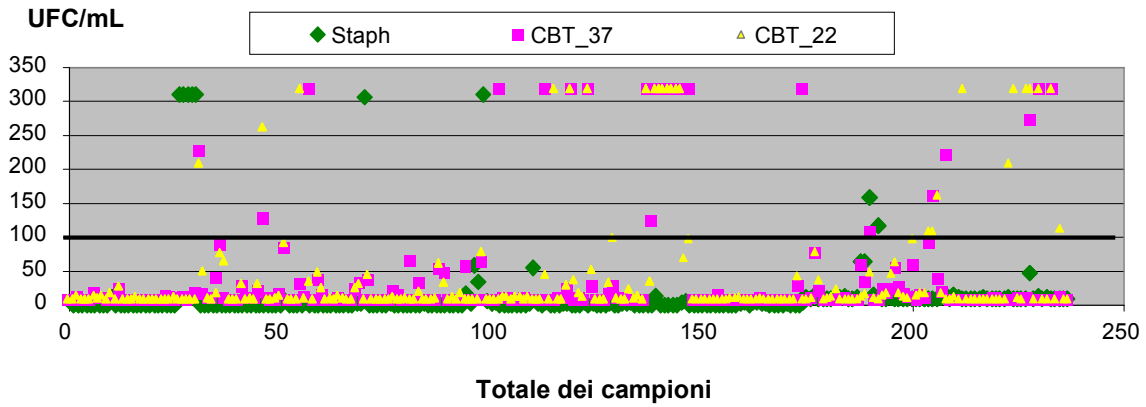


Figura 9. Valori di *Staphylococcus* spp. confrontati con la CBT a 22°C e a 37°C, per il totale dei campioni, in ogni punto di prelievo a parità di sito e di data di campionamento

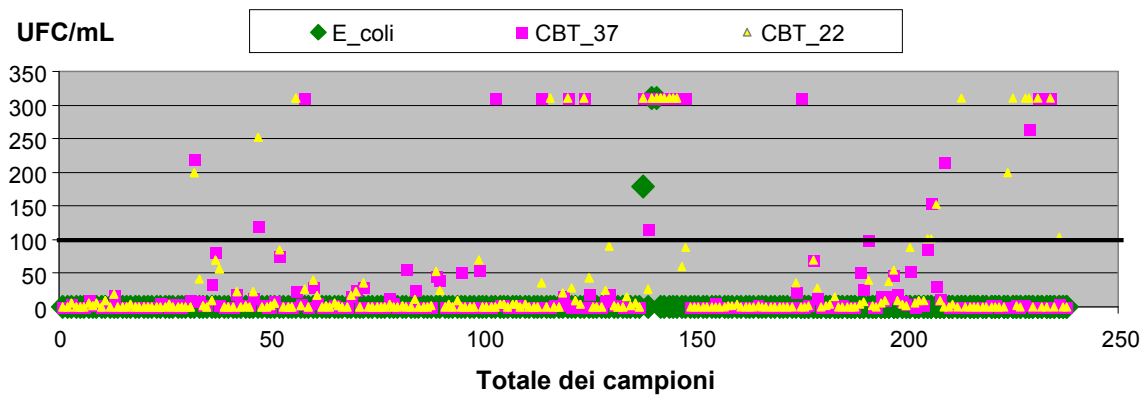


Figura 10. Valori di *Escherichia coli* confrontati con la CBT a 22°C e a 37°C, per il totale dei campioni in ogni punto di prelievo a parità di sito e di data di campionamento

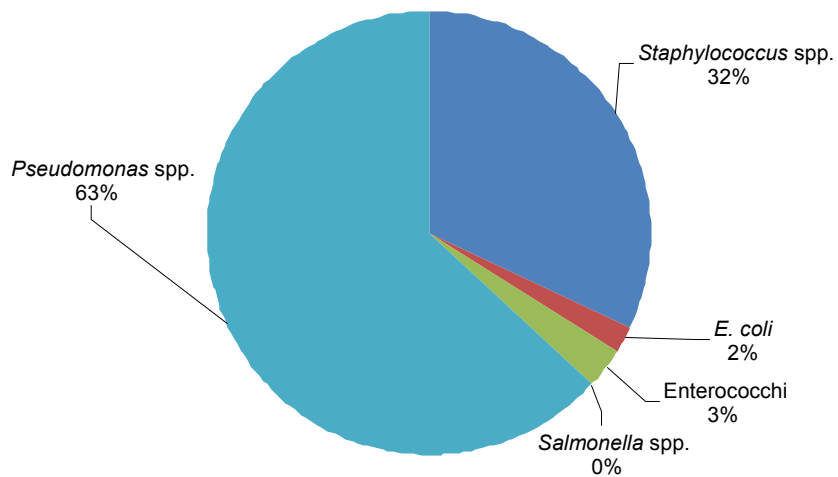


Figura 11. Percentuali di campioni che presentano valori positivi, divisi per patogeni e indicatori

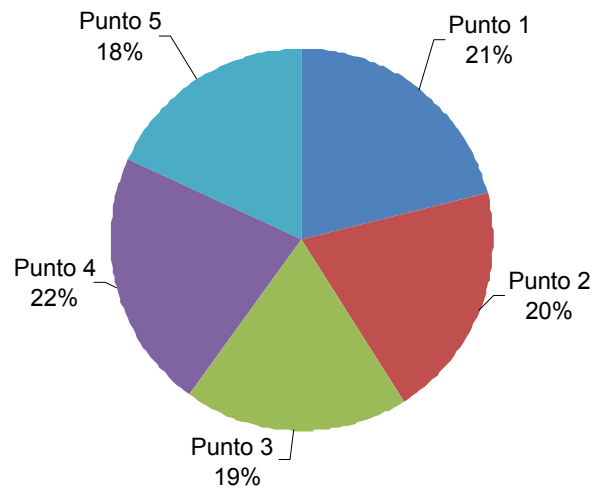


Figura 12. Campioni positivi per *Pseudomonas* spp. (119 campioni), divisi per punti di prelievo

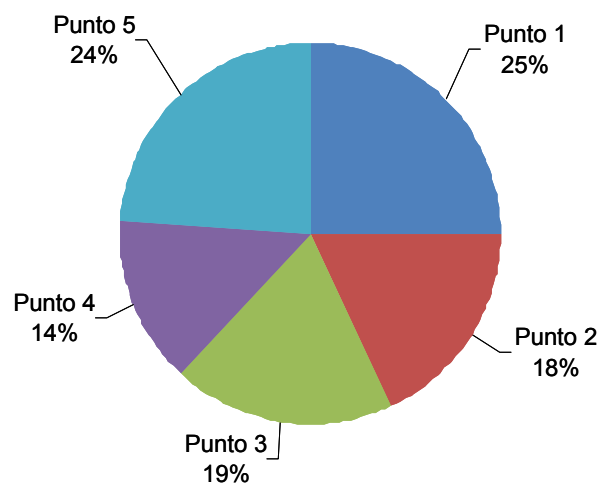


Figura 13. Campioni positivi per *Staphylococcus* spp. (63 campioni), divisi per punti di prelievo

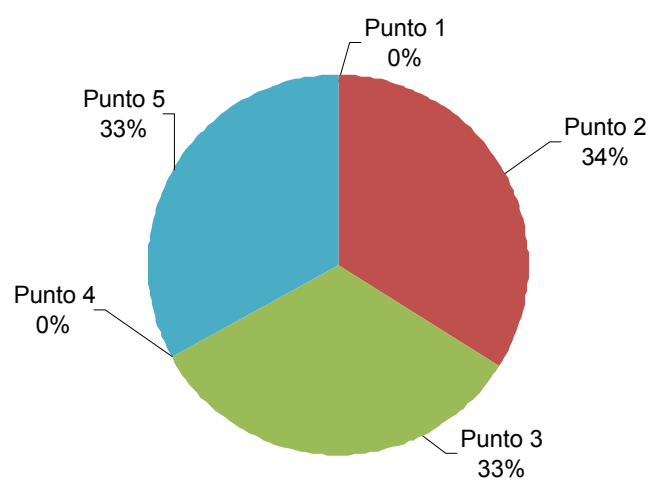


Figura 14. Campioni positivi per *Escherichia coli* (3 campioni), divisi per punti di prelievo

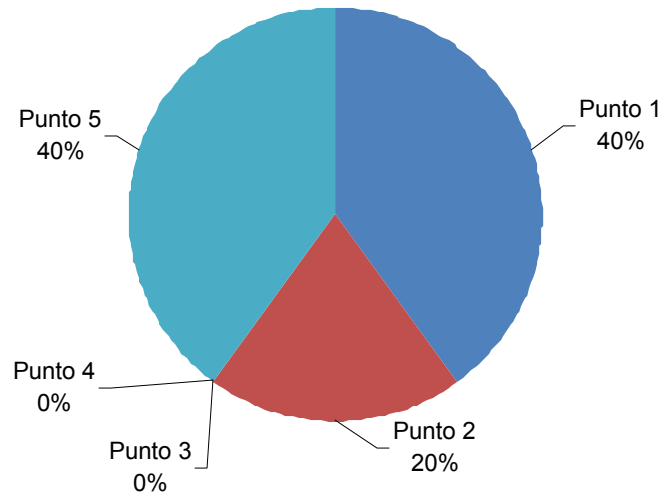


Figura 15. Campioni positivi per Enterococchi intestinali (5 campioni), divisi per punti di prelievo

Disseminazione

Il 1° ottobre 2013 presso l'Istituto Superiore di Sanità si è tenuta la giornata di Studio "Metodologie microbiologiche per le acque industriali utilizzate nel settore dei dispositivi medici" per comunicare agli addetti ai lavori lo stato di avanzamento del progetto.

L'11 e il 12 dicembre 2014 a Roma, presso l'Istituto Superiore di Sanità, si è tenuto il Convegno nazionale "Le acque utilizzate nell'industria dei dispositivi medici". In quell'occasione sono stati presentati i risultati del progetto, tra cui un'analisi statistica della qualità dell'acqua utilizzata dalle aziende italiane produttrici di dispositivi medici a partire dalle risultanze sperimentali sui campionamenti eseguiti, uno studio sullo stato dell'arte in termini di trattamenti e di controlli svolti sulle acque utilizzate, nonché la linea guida. Lo scopo del convegno è stato fornire supporto sia all'industria che ai laboratori di analisi che lavorano nel settore dei dispositivi medici.

L'evento, organizzato in collaborazione con il Ministero della Salute, è stato l'occasione per mettere a confronto le esperienze di varie aziende e operatori del settore nel formulare delle soluzioni alle criticità ed ai problemi emersi, condividendo le raccomandazioni espresse nella linea guida per favorirne l'adozione nella pratica.

È stata predisposta una sessione dedicata ai poster nella quale i partecipanti hanno descritto con maggiore accuratezza aspetti particolari o esperienze legati al progetto.

Considerazioni conclusive

Tracciare la linea delle conclusioni a 36 mesi del progetto è complesso poiché, al di là degli obiettivi prefissati e raggiunti, molta attività collaterale è stata svolta per conseguirli. Un percorso lungo che ci ha fatto conoscere realtà produttive significative per il Paese Italia con la piena disponibilità dei responsabili per raggiungere gli obiettivi del progetto condiviso.

Lo studio è stato articolato in varie fasi: dalla individuazione di eventuale letteratura di settore che si è dimostrata scarsa o totalmente assente, alla stesura di un questionario e alla sua compilazione presso le aziende, scelte sulla base dei dispositivi medici prodotti, in cui l'acqua gioca un ruolo chiave, e della distribuzione geografica. Dall'esperienza e dai risultati acquisiti con questo studio sperimentale, è stata redatta la "Linea guida italiana sugli aspetti microbiologici delle acque utilizzate nell'industria dei dispositivi medici", dedicata alle raccomandazioni per il controllo microbiologico delle acque utilizzate nella produzione dei dispositivi medici (D'Ugo *et al.*, 2016; Marcheggiani *et al.*, 2016).

La metodologia utilizzata per redigere la linea guida ha tenuto conto di quanto riportato nel Manuale Metodologico del Sistema Nazionale per le Linee Guida del 2011 "Come produrre, diffondere e aggiornare linee guida per la salute pubblica" (NIIEBP, 2011).

Sono state riportate 12 raccomandazioni, suddivise per grandi tematiche.

- La Raccomandazione 1 riguarda l'uso della Farmacopea in assenza di norme specifiche, per il monitoraggio e il controllo delle acque utilizzate nel settore dei dispositivi medici.
- La Raccomandazione 2 è riferita all'acqua in ingresso all'azienda: infatti, nonostante la maggior parte delle aziende utilizzino acqua potabile, una percentuale minore usa acque superficiali o sotterranee che devono essere trattate prima del loro utilizzo.
- Le Raccomandazioni 3, 4 e 5 riguardano il campionamento per le analisi microbiologiche: questo si può considerare una fase cruciale di tutto il sistema di analisi e le raccomandazioni potrebbero portare ad una omogeneità nella pratica.
- Le Raccomandazioni 6, 7, 8, 9 e 10 sono rivolte al sistema di analisi degli indicatori microbiologici e i risultati dello studio danno informazioni sul loro eventuale inserimento nel monitoraggio di routine.
- La Raccomandazione 11 riguarda il monitoraggio: nonostante la sua cadenza è dettata dalle necessità delle aziende, è utile programmare per il parametro *Pseudomonas* spp. una cadenza di almeno 15 giorni per poter prevenire e gestire l'eventuale formazione di biofilm e ridurre i rischi di un potenziale scadimento della risorsa.
- La Raccomandazione 12 tratta il tema dei tempi di sanificazione dell'impianto ed è strettamente connessa alla Raccomandazione 11 poiché ogni gestore deve cogliere, nei risultati del monitoraggio, gli eventuali segnali di allerta e quindi procedere a una sanificazione dell'impianto.

La linea guida è pubblicata dal Ministero della Salute sul suo portale (Mancini *et al.* 2015)

La metodologia tracciata, il coinvolgimento di personale tecnico e di portatori di interessi e la realizzazione dei prodotti, permette di avere un punto di partenza per improntare eventuali ulteriori studi su tematiche simili. Inoltre, si riportano alcuni approfondimenti correlati nella sezione dedicata del presente rapporto.

Bibliografia

- D'Ugo E, Marcheggiani S, D'Angelo A M, Caciolli S, Puccinelli C, Giuseppetti R, Marcoaldi R, Romanelli C, Mancini L. Microbiological water quality in the medical device industry in Italy. *Microchem J* 2016; <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.012>.
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. Family I. Pseudomonadaceae. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. vol. 2: The Proteobacteria, part B: The Gammaproteobacteria. New York: Springer; 2005. p. 323.
- Health Canada. *Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines – 2009, Version 2 (GUI-0001)*. Ottawa: Health Canada; 2011. Disponibile all'indirizzo: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/compli-conform/gmp-bpf/docs/gui-0001-eng.php>; ultima consultazione 27/02/2017.
- Italia, 2010. Decreto Ministro della Salute 16.03.2010. *Gazzetta Ufficiale* n. 77 del 2/4/2010.

- Italia. Decreto Legislativo n. 31 – 2 febbraio 2001. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. Gazzetta Ufficiale n. 52 del 3/3/2001.
- Italia. Decreto Ministro della Salute 03.12.2008. Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 304 del 31/12/2008.
- Mancini L, Romanelli C, Marcheggiani S, Grasso C, *et al.* *Linea guida italiana sugli aspetti microbiologici delle acque utilizzate nell'industria dei dispositivi medici*. Roma: Ministero della Salute; Istituto Superiore di Sanità; 2015. Disponibile all'indirizzo: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2421_allegato.pdf; ultima consultazione 01/02/2017).
- Marcheggiani S, Romanelli C, D'Angelo AM, Pierdominici E, Cacioli S, Puccinelli C, Giuseppetti R, D'Ugo E, Volpi E, Volpi F, Figliomeni M, Mancini L. First Italian guidelines to ensure the microbiological safety of water used in the medical device industry - An operational tool. *Microchemical Journal* 2016; <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.011>.
- NIIeBP (Sistema nazionale per le linee guida Network Italiano Evidence based Prevention). *Come produrre, diffondere e aggiornare linee guida per la salute pubblica. Manuale metodologico - Sistema nazionale per le linee guida (ISS-SNLG)*. Roma: Ministero della Salute e Istituto Superiore di Sanità; 2011.
- Palleroni NJ. Genus I. Pseudomonas. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. vol. 2: The Proteobacteria, part B: The Gammaproteobacteria. New York: Springer; 2005. p. 323-79.
- Popoff MY, Le Minor LE. Genus XXXIII. Salmonella. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. vol. 2: The Proteobacteria, part B: The Gammaproteobacteria. New York: Springer; 2005. p. 764-99
- Popoff MY, Le Minor LE; WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. *Formules antigéniques des sérovars de Salmonella*. 8th ed. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella; 2001.
- Scheutz F, Strockbine NA. Genus I. Escherichia. In: Vos P, Garrity GM, Jones, D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitmann W (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. vol. 3: The Firmicutes. New York: Springer; 2009. p. 607-24.
- Schleifer KH, Bell JA. Genus I. Staphylococcus. Vos P, Garrity GM, Jones, D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitmann W (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed. vol. 3: The Firmicutes. New York: Springer; 2009. p. 392-421.
- Švec P, Devriese L. Genus I. Enterococcus. In: Vos P, Garrity GM, Jones, D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitmann W (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. vol. 3: The Firmicutes. New York: Springer; 2009. p. 594-607.
- UNI EN ISO 19458:2006. *Qualità dell'acqua - Campionamento per analisi microbiologiche*. Milano: Ente Italiano di Unificazione; 2006.
- UNI EN ISO 5667-1:2007. *Qualità dell'acqua - Campionamento - Parte 1: Linee guida per la definizione dei programmi e delle tecniche di campionamento*. Milano: Ente Italiano di Unificazione; 2007.
- UNI EN ISO 5667-3:1998. *Qualità dell'acqua - Campionamento - Guida per la conservazione e il maneggiamento di campioni*. Milano: Ente Italiano di Unificazione; 1998.
- UNI EN ISO 5667-3:2004. *Qualità dell'acqua - Campionamento - Parte 3: Guida per la conservazione e il maneggiamento di campioni d'acqua*. Milano: Ente Italiano di Unificazione; 2004.

Allegati al capitolo

A1. Questionario informativo

Data compilazione:

Codice identificativo della Ditta (Codice ID):

DATI DITTA		
1	Ragione sociale	
2	Regione (della sede legale)	
3	Numero di dipendenti	
4	Fabbricante o terzista	
5	Possiede un sistema di qualità certificato	
6	Applica le GMP	
7	Mercato di riferimento (europea, nazionale, extra europeo)	
PRODOTTI		
8	Dispositivi medici	
9	Se realizza dispositivi medici quale tipologia	
10	Cosmetici	
11	Integratori	
12	Farmaci	
13	Biocidi	
14	Altra tipologia	
	NOTE	
STRUTTURA		
15	Gli ambienti di produzione (lavaggio, preparazione, confezionamento, ecc.) sono a contaminazione controllata	
16	Se si, sono validati	
17	Se si, in che classe sono	
	NOTE	
PRODUZIONE		
18	Viene utilizzata l'acqua per il processo produttivo/prodotto	
19	In quali fasi del processo viene utilizzata l'acqua (lavaggio componenti, miscelazione, sterilizzazione, ecc.)	
20	Che tipo di acqua viene utilizzata (potabile, non potabile di rete, di pozzo, ecc.)	
21	Che tipo di trattamento viene svolto	
22	Quali controlli vengono effettuati	
23	La periodicità dei controlli	
24	I controlli sono svolti internamente o esternamente	
25	Se svolti esternamente, sono effettuati da un laboratorio accreditato	
	NOTE	
LABORATORIO		
26	Internamente è presente un laboratorio microbiologico o chimico-fisico	
27	L'acqua utilizzata in laboratorio è la stessa che viene usata in produzione	
28	La ditta utilizza un solo impianto o due impianti separati	
	NOTE	

RICICLO		
29	Cosa viene fatto con l'acqua di scarto	
30	Viene venduta acqua di derivazione industriale	
	NOTE	
FORMAZIONE		
31	Nella formazione dei dipendenti la ditta include corsi relativi all'acqua e alle sue possibili contaminazioni microbiologiche	
32	Se si quali sono stati gli argomenti dei corsi	
33	La periodicità dell'aggiornamento della formazione relativamente a questo aspetto	
	NOTE	
MANUTENZIONE		
34	La manutenzione dell'impianto da chi viene fatta	
35	La periodicità delle attività di manutenzione	
36	Cosa si intende per manutenzione ordinaria	
37	Cosa si intende per manutenzione straordinaria	
38	La pulizia da chi viene svolta e con quali modalità e periodicità	
	NOTE	
VERIFICHE ISPETTIVE		
39	Durante le VII viene controllato anche l'impianto di purificazione dell'acqua	
40	Se si, quali aspetti vengono controllati	
41	Quale risulta l'incidenza delle non conformità sull'impianto dell'acqua negli ultimi 5 anni	
	NOTE	
EVENTI AVVERSI		
42	Si sono riscontrati problemi con il ciclo dell'acqua e con l'impianto di purificazione	
43	Se si, che tipo di problemi	
44	La Ditta quale tipo di risoluzione ha applicato	
	NOTE	

A2. Schemi dei protocolli utilizzati per la determinazione dei microrganismi

A2.1. Protocollo di lavoro per la determinazione della Conta Batterica Totale a 22°C e 37°C da acque ad uso industriale

Scopo: Rilevamento di Colonie Totali (CBT)

METODO DI ANALISI

Principio del metodo

L'isolamento ottimale di Colonie Totali (Conta Batterica Totale, CBT) si ottiene con il metodo di Inclusione

Bibliografia di riferimento

UNI EN ISO 6222. Qualità dell'acqua - Valutazione quantitativa dei microrganismi vitali. Conteggio delle colonie per inoculo su terreno agarizzato. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2001

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 April 2002. Geneva: WHO; 2003. p. 29-33

Quantità di campione da analizzare:

1 mL

Fase di isolamento. Semina 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 120 144 ore.

Espressione dei risultati:

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

A2.2. Protocollo di lavoro per la determinazione di *Pseudomonas aeruginosa* da acque ad uso industriale

Scopo : Rilevamento di *Pse. aeruginosa*

Metodo di analisi:

Principio del metodo: L'isolamento ottimale di *Pse. aeruginosa* si ottiene con il metodo del Membrane Filtranti (MF)

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

Quantità di campione da analizzare:

250mL

Fase di filtrazione - 250 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtri 0,45 µm di nitrocellulosa.

Fase di isolamento. Semina terreno selettivo

CN agar

42° ± 1°C per 48 ore

Ogni filtro è posto su una piastra Petri che contiene il terreno selettivo.

Espressione dei risultati: Dopo l'incubazione le colonie caratterizzate da una colorazione nerastra, tenendo conto della suddivisione delle colonie nere con e senza alone.

UFC/mL

Prove di conferma

Ossidasi secondo i metodi classici.

Conservazione dei campioni

Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche. (-20°C)

A2.3. Protocollo di lavoro per la determinazione di *Staphylococcus aureus* da acque ad uso industriale

Scopo : Rilevamento di *S. aureus*

Metodo di analisi:

Principio del metodo: L'isolamento ottimale di *S. aureus* si ottiene con il metodo del Membrane Filtranti (MF)

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

Quantità di campione da analizzare:

250mL

è comunque in funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare

Fase di filtrazione - 250 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtri 0,45 µm di nitrocellulosa.

Fase di isolamento. Semina terreno selettivo

Agar Baird Parker (BP Agar)

37 ± 1°C per 48 ore

Ogni filtro è posto su una piastra Petri che contiene il terreno selettivo.

Espressione dei risultati: Dopo l'incubazione le colonie caratterizzate da una colorazione nerastra, tenendo conto della suddivisione delle colonie nere con e senza alone.

UFC/mL

Prove di conferma

Coagulasi e Catalasi secondo i metodi classici.

Conservazione dei campioni

Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche. (-20°C)

A2.4. Protocollo di lavoro per la determinazione di Enterococchi intestinali da acque ad uso industriale

Scopo : Rilevamento di Enterococchi intestinali
<p>Metodo di analisi: Principio del metodo: L'isolamento ottimale di Enterococchi si ottiene con il metodo del Membrane Filtranti (MF)</p> <p>UNI EN ISO 7899-2 – 2003 Ricerca ed enumerazione di <i>Enterococchi intestinali</i> - Metodo di Filtrazione su membrana. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed . Washington, DC: APHA; 2005</p> <p>Quantità di campione da analizzare: 100 mL è comunque in funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare</p>
<p>Fase di filtrazione - 100 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtri 0,45 µm di nitrocellulosa.</p>
<p>Fase di isolamento. Semina terreno selettivo</p> <p style="text-align: center;">Slanetz e Bartley (SB)</p> <p style="text-align: center;">37 ± 1°C per 44 ± 4 ore</p> <p>Ogni filtro è posto su una piastra Petri che contiene il terreno selettivo.</p>
<p>Espressione dei risultati: Dopo l'incubazione le colonie caratterizzate da una colorazione blu-verde, sono contate ed i risultati espressi in "Unità Formanti Colonie" in 100 mL</p> <p style="text-align: center;">UFC/100 mL</p> <p>La colorazione rosso-scuro è dovuta alla riduzione del 2,3,5 Triphenyl,Tetrazolium Chloride.</p>
<p>Prove di conferma</p> <p>Idrolisi dell'Esculina con il metodo classico o utilizzando Test biochimici miniaturizzati API 20 NE</p>
<p>Conservazione dei campioni</p> <p style="text-align: center;">Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche. (-20°C)</p>

A2.5. Protocollo di lavoro per la determinazione di *Escherichia coli* da acque ad uso industriale

Scopo : Rilevamento di <i>E. coli</i>
Metodo di analisi: Principio del metodo: L'isolamento ottimale di <i>E. coli</i> si ottiene con il metodo del Membrane Filtranti (MF) UNI EN ISO 9308-1 – 2002 Ricerca ed enumerazione di <i>E. coli</i> e batteri coliformi .Metodo di Filtrazione su membrana. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed ,.Washington, DC: APHA; 2005 Quantità di campione da analizzare: <p style="text-align: center;">100 mL</p> è comunque in funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare
Fase di filtrazione - 100 mL di campione vengono filtrati con una pompa ad acqua su filtri 0,45 µm di nitrocellulosa.
Fase di isolamento. Semina terreno selettivo <p style="text-align: center;">Tryptone, Bile salts, agar, X-Glu (TBX)</p> <p style="text-align: center;">44 ± 1°C per 18 ÷ 24 ore</p> Ogni filtro è posto su una piastra Petri che contiene il terreno selettivo.
Espressione dei risultati: Dopo l'incubazione le colonie caratterizzate da una colorazione blu-verde, sono contate ed i risultati espressi in "Unità Formanti Colonie" in 100 mL <p style="text-align: center;">UFC/100mL</p> La colorazione delle colonie è dovuta alla capacità enzimatica di <i>E. coli</i> , avviene una reazione idrolitica ad opera dell'enzima β-glucuronidasi e del cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D glucuronide (X-Gluc) presente nel terreno.
Prove di conferma Verifica della citocromo ossidasi e produzione di indolo con i metodi classici o utilizzando Test biochimici miniaturizzati API 20E
Conservazione dei campioni Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche. (-20°C)

A2.6. Protocollo di lavoro per la determinazione di *Salmonella* spp. da acque ad uso industriale

Scopo : Rilevamento di <i>Salmonella</i> spp
<p>Metodo di analisi: Principio del metodo: L'isolamento ottimale di <i>Salmonella</i> si ottiene con un pre arricchimento seguito da un arricchimento e semina su terreno selettivo. EN ISO 6579 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of <i>Salmonella</i> spp. Rev Edition: 2007-11-01. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on <i>Salmonella</i>. Michel Y. Popoff and Léon Le Minor Formules Antigeniques des Serovars de <i>Salmonella</i>. Geneve; WHO; 2001 American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed ,.Washington, DC: APHA; 2005 Quantità di campione da analizzare: 1L è comunque in funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare</p>
<p>Fase di pre –arricchimento -rivitalizzazione dei microrganismi in un idoneo brodo di coltura non selettivo.</p> <p style="text-align: center;">Acqua peptonata $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 16÷22 ore</p>
<p>Fase Arricchimento</p> <p style="text-align: center;">Rappaport Vassiliadis brodo $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18÷24 ore</p>
<p>Fase di isolamento. Semina terreno selettivo</p> <p style="text-align: center;">McConkey .</p> <p style="text-align: center;">$36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18 ÷ 24 ore</p>
<p>Prove di conferma</p> <p>Colonie tipiche colonie non tipiche Sottoporre a conferma almeno 1 colonia sospetta per piastra. Ripassare su Nutrient Agar. Eseguire il test della galattosidasi , indolo e il test VP. La conferma sierologica per la determinazione degli antigeni di <i>Salmonella</i> con il test di agglutinazione su vetrino.</p>
<p>Espressione dei risultati:</p> <p style="text-align: center;">ufc/ml</p>
<p>Conservazione dei campioni</p> <p style="text-align: center;">Ripasso su terreno nutritivo (TSA) e conservazione in crio-banche. (-20°C)</p>