

RELAZIONE DI VALIDAZIONE

VALIDAZIONE PROCESSO DI LAVAGGIO SECONDO LA NORMA ISO 14698-1 : 2003 “APPENDICE E”

COMMITTENTE: **NAVIGLIO SRL**
VIA PER ISORELLA, 15
25010 VISANO (BS)

LUOGO DELLA VALIDAZIONE: **LAVANDERIA STEFANI**
VIA PER ISORELLA, 15
25010 VISANO (BS)

PROCESSO IN ESAME: LAVAGGIO TESSILI



C.Pirrò
(Responsabile di Laboratorio)

DATA:21/10/2023

INDICE

-SOMMARIO	pag. 3	
-INTRODUZIONE	pag. 5	
-PROCEDURA SPERIMENTALE	pag. 6	
-Materiale in esame	pag. 6	
-Sistema di saggio	pag. 6	
-Terreni colturali e reagenti	pag. 9	
-Apparecchiatura e vetreria	pag. 10	
-Esecuzione del saggio	pag. 10	
-INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI	pag. 12	
-RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	pag. 12	
-LUOGO DI CONSERVAZIONE DEI DATI GREZZI	pag. 13	
-PROCEDURE	pag. 13	
-RISULTATI	pag. 13	
-CONCLUSIONI	pag. 16	
-APPENDICI	pag. 16	
-Appendice N° 1	Calcolo della validità delle prove	pag. 18
-Appendice N° 2:	Programmi di lavaggio	pag. 21

SOMMARIO

E' stato effettuato uno studio per verificare l'efficacia battericida, lieviticida, fungicida dei processi di lavaggio tessili in lavacontinua, effettuati presso la **Lavanderia Industriale Stefani Via per Isorella, 15 – 25010 VISANO (BS)**. A tale scopo provini di cotone sono stati contaminati con 5 differenti tipi di microrganismi.

I microrganismi utilizzati sono stati i seguenti:

<u>Enterococcus hirae</u>	ATCC 10541
<u>Escherichia coli</u>	ATCC 10536
<u>Saccharomices cerevisiae</u>	ATCC 9080
<u>Aspergillus brasiliensis (ex niger)</u>	ATCC 16404

Per ogni ciclo di lavaggio sono stati utilizzati 3 provini di controllo contaminati con un titolo noto di microrganismi per ogni microrganismo utilizzato, 4 provini contaminati non sottoposti a lavaggio (controllo b) e 1 provino sottoposto a lavaggio e contaminato solo dopo il processo di lavaggio (controllo c).

Una volta contaminati i provini di controllo, sono stati sottoposti ai normali cicli di lavaggio.

Al termine di ogni processo di lavaggio i provini sono stati prelevati inviati al centro di saggio e sottoposti a un conteggio microbiologico, per valutare quantitativamente la presenza di microrganismi su ogni singolo provino.

Sulla base dei risultati ottenuti, nelle condizioni sperimentali adottate, si può affermare che i cicli di lavaggio relativi ai tessili, effettuati **Lavanderia Industriale Stefani Via per Isorella, 15 – 25010 VISANO (BS)** in data 17 Ottobre 2023 sono risultati essere:

EFFICACI

nel ridurre la contaminazione a carico dei batteri, dei lieviti e dei funghi.

INTRODUZIONE

Per incarico della Società **Naviglio Srl Via per Isorella, 15 – 25010 VISANO (BS)** è stato eseguito uno studio al fine di verificare l'efficacia disinfettante del processo di lavaggio. I programmi di lavaggio, impostati secondo le linee guida della **Lavanderia Industriale Stefani Via per Isorella, 15 – 25010 VISANO (BS)**, sono stati effettuati presso la lavanderia stessa; la preparazione dei carrier e il successivo controllo microbiologico è stato effettuato presso il centro di analisi **TESTING POINT 5 Srl Via di Castel Romano, 100 - ROMA**.

La validazione è stata effettuata il giorno 17 Ottobre 2023.

I controlli microbiologici sono iniziati il giorno 18 Ottobre 2023 e sono terminati in data 21 Ottobre 2023.

TERMINI E DEFINIZIONI:

<i>CARRIER</i>	:	Provini del medesimo tipo di dei tessili oggetto di validazione
<i>MICROORGANISMO TEST</i>	:	Microrganismi di saggio
<i>INDICATORI BIOLOGICI</i>	:	Carrier con i Microrganismi

PROCEDURA SPERIMENTALE

1. MATERIALE IN ESAME

I programmi di lavaggio, effettuati sono stati forniti dal Committente

- Progr. F.Ili Rosa 10 Kg Lavacontinua Albergo
- Progr. F.Ili Rosa 80 Kg Lavacentrifuga Delicato Bassa Temperatura 60°C

Data ricevimento : 17.10.2023

2. SISTEMA DI SAGGIO

2.1 Carrier

I carrier erano rappresentati da provini della superficie di 50 cm² (10 cm x 5 cm di lato compresa un'area di 5x5 cm² per la contaminazione) del medesimo tipo di quelli sottoposti al processo di lavaggio.

2.1.1 *Preparazione dei carrier*

I carrier sono stati sterilizzati in autoclave a 121°C per 20 minuti, e quindi asciugati in termostato a 44°C per 12 ore.

2.2 Microrganismi test

2.2.1 *Identificazione*

Sono stati utilizzati i seguenti ceppi test:

<u>Enterococcus hirae</u>	ATCC 10541
<u>Escherichia coli</u>	ATCC 10536
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	ATCC 9080
<u>Aspergillus niger</u>	ATCC 16404

TESTING POINT 5 srl

c/o TECNOPOLO S.p.A. – Via di Castel Romano, 100 - 00128 Roma
tel. +39.06.95227374 fax + 39.06.95227375 - e-mail: roma@retebiolab.com

P.IVA 09077751007

2.2.2 Scelta del sistema di saggio

I ceppi in questione sono stati scelti secondo la norma ISO 14698-1:2003 Camere bianche ed ambienti associati controllati "Controllo della biocontaminazione" appendice E.

2.2.3 Centro di provenienza

I ceppi sono stati acquistati presso BIOGENETICS SRL Via Germania, 1/B-Z.I.P. Europa 35020 Ponte San Nicolò (PD) e sono gestiti in Cryobank in conformità alla Procedura Tecnica PT.003. Rev. corrente.

2.2.4 Preparazione delle sospensioni di batteri

I ceppi batterici sono stati trapiantati per tre volte di seguito su slant di TSA e incubati a 37°C per 18 ore.

La coltura finale è stata risospesa in diluente usando palline di vetro; la sospensione è stata diluita fino ad ottenere una concentrazione di circa $10^8 - 10^9$ cfu/ml.

E' stato effettuato un conteggio per inclusione in agar.

2.2.5 Preparazione delle sospensioni di miceti

Dagli slants di mantenimento con l'aiuto di palline di vetro, e' stata ottenuta una sospensione di conidiospore con diluente contenente 0.05% di polisorbato 80.

Dopo accurata agitazione, la sospensione è stata trasferita in una provetta sterile e filtrata in modo da allontanare eventuali miceli.

Le spore sono state diluite fino ad ottenere una concentrazione di circa $10^7 - 10^8$ cfu/ml.

E' stato effettuato un conteggio per inclusione in agar.

2.2.6 Preparazione degli indicatori biologici (punto E.2.6.2)

I provini stati contaminati con 0,5 ml di una miscela composta da 3 ml di sospensione di microrganismi e 2 ml di soluzione proteica per contatto di 5 minuti a temperatura ambiente.

Per ogni ciclo di lavaggio sono stati utilizzati 3 provini;

2.2.8 Preparazione dei controlli (Punto E.2.1)

Controllo A:

Dalla diluizione della sospensione di inoculo, contenente da 30 a 300 UV, è stata eseguita la conta in doppio delle Unità Vitali su terreno agarizzato. La media delle due conte è stata denominata N.

Il numero di UV della sospensione originale è risultato $\geq 10^8$ per le cellule batteriche e fungine

Controllo B:

2 provini di controllo contaminati con 0,5 ml della sospensione contenente da 30 a 300 UV ed altri 2 provini di controllo contaminati con 0,5 ml della sospensione contenente da 300 a 3000 UV. Questi provini di controllo sono stati trattati con le stesse modalità dei provini utilizzati per la validazione effettiva, con l'eccezione del processo di lavaggio. La conta media corrispondente ai pezzi di controllo maggiormente contaminati è denominata N'1 e l'altra è denominata N'2.

Controllo C:

Ad 1 provino di controllo è stato aggiunto 0,5 ml di soluzione proteica. Il provino di controllo è stato quindi sottoposto all'intero processo di lavaggio, recuperato e trasferito in laboratorio per la valutazione dell'effetto antimicrobico residuo.

3. TERRENI CULTURALI E REAGENTI

Plate Count Agar + TTC 0,05% Biogenetics

3.1 TERRENO DI SOSPENSIONE

Tween 80	50 ml
Peptone	10 g
Cloruro di sodio	5 g
Fosfato di sodio	3,5 g
Fosfato monopotassico	1,5 g
Acqua distillata q.b. a	1000 ml

3.2 SOLUZIONI PROTEICHE

Soluzione A: albumina bovina al 3% (*P/V*) (frazione di Cohn V), portata pH = 6,8 ± 0,2 se necessario, sterilizzata con filtrazione su membrana.

Soluzione B: estratto di lievito al 15% (*P/V*) portata a pH = 7 ± 0,2, sterilizzata in autoclave e vapore.

Soluzione C: le soluzioni A e B sono miscelate nel rapporto 100:20, in modo che la concentrazione di ogni proteina sia 2,5% (*P/V*).

3.3 LIQUIDO PER LA PREPARAZIONE DELLE SOSPENSIONI MICROBICHE

Peptone Tryptone di Caseina	1,0 g
Cloruro di sodio	8,5 g
Acqua distillata sterile q.b.a	1000 ml

TESTING POINT 5 srl

c/o TECNOPOLO S.p.A. – Via di Castel Romano, 100 - 00128 Roma
tel. +39.06.95227374 fax + 39.06.95227375 - e-mail: roma@retebiolab.com

P.IVA 09077751007

4. APPARECCHIATURA E VETRERIA

Autoclave a vapore	PBI
Termostati	F.LLI GALLI
pHmetro	JENWAY
Agitatore Vortex	VELP
Stomacker	ITALSCIENTIFICA
Rampa Filtrante	VACUUM TECHNOLOGY

5. ESECUZIONE DEL SAGGIO

5.1 Esecuzione delle prove di lavaggio

Gli indicatori biologici sono stati trasportati presso la lavanderia mediante frigorifero portatile alla temperatura compresa tra 1 e 4°C.

I singoli indicatori biologici sono stati introdotti nel ciclo di lavaggio prescelto di volta in volta, insieme al carico completo in modo da rispettare in pieno le condizioni reali di lavaggio.

Una volta terminato il ciclo di lavaggio, gli indicatori biologici sono stati prelevati ed introdotti in sacchetti da richiudibili sterili, riposti nel frigorifero e trasportati al centro di saggio.

5.2 Conteggio dei microrganismi sui carrier dopo il lavaggio

Per effettuare il controllo microbiologico i provini sono stati immersi singolarmente in 100 ml di terreno di recupero.

I provini sono stati mantenuti in agitazione allo stomacker per 15-30'.

Differenti aliquote in ml (0,1/ 1/ 98,9) sono state filtrate per 3 volte attraverso una membrana da 0.45 µm utilizzando frazioni di 50 ml di terreno di recupero.

Le membrane sono state poste su piastre di terreno nutritivo agarizzato ed incubate a 30°C per 72 ore.

Infine ciascun provino è stato posto asetticamente in una capsula Petri e ricoperto con terreno nutritivo agarizzato ed incubato alle stesse condizioni

5.3 **Calcolo dei risultati**

Per ogni indicatore biologico è stato calcolato il logaritmo del numero di microrganismi.

E' stato determinato il numero di riduzioni decimali della popolazione microbica o

efficacia del trattamento " **d**" eseguendo il seguente calcolo:

$$(1) \mathbf{d} = \log n - \log (n'1 + n'2) = \log n / (n'1 + n'2)$$

Dove :

n = numero di U.V. della sospensione originale

n'1+n'2= media delle conte di U.V. determinate sulle membrane + numero di UV determinate sui provini

E' stato calcolato il rapporto del numero N di microrganismi della popolazione microbica iniziale applicato ai provini di controllo R, attraverso il seguente calcolo:

$$(2) \mathbf{N/R}$$

Dove:

N (n) = numero di U.V. della sospensione originale

R(n'1+n'2) = media delle conte di U.V. determinate sulle membrane + numero di UV determinate sui provini

E' stato verificato che il valore ottenuto dalla differenza logaritmica (1) sia uguale al rapporto di N/R (2), al fine di garantire la riduzione di almeno 10^5 del numero di batteri e la riduzione ad almeno 10^4 del numero del numero di lieviti e funghi e di almeno 10^3 del numero delle spore.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il lavaggio viene considerato efficace quando si ottiene una riduzione di:

5 log tra il numero di batteri presenti nella sospensione originale e numero dei batteri presenti sull'indicatore biologico sottoposto al lavaggio;

4 log tra il numero di miceti e delle spore fungine presenti nella sospensione originale e numero dei miceti e delle spore fungine presenti sull'indicatore biologico sottoposto al lavaggio;

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Normalisation Francaise, G 07-172, Juillet 1992, Textiles Articles textiles traites en blanchisserie "*Methodes de controle et d'essai de la qualite hygienique du linge- Propete hygienique*"

UNI EN 14065, gennaio 2016 Tessili trattati in lavanderie "Sistema di controllo della biocontaminazione"

ISO 14698-1:2003 Camere bianche ed ambienti associati controllati "Controllo della biocontaminazione" appendice E.

TESTING POINT 5 srl

c/o TECNOPOLO S.p.A. – Via di Castel Romano, 100 - 00128 Roma
tel. +39.06.95227374 fax + 39.06.95227375 - e-mail: roma@retebiolab.com

P.IVA 09077751007

LUOGO DI CONSERVAZIONE DEI DATI GREZZI

Tutti i dati grezzi, e gli altri documenti generati nel corso dello studio, sono conservati negli archivi TESTING POINT 5 SRL insieme ad una copia del rapporto finale.

I documenti in cui è stato definito il Sistema Formale relativo alla norma ISO 14698-1:2003, rispetto alla presente Appendice E, sono definiti nei Documenti del Sistema Qualità Rete Biolab.

PROCEDURE

Le procedure utilizzate nello studio sono documentate nei Documenti nei Sistema di TESTING POINT 5 SRL.

TESTING POINT 5 srl

c/o TECNOPOLO S.p.A. – Via di Castel Romano, 100 - 00128 Roma
tel. +39.06.95227374 fax + 39.06.95227375 - e-mail: roma@retebiolab.com

P.IVA 09077751007

RISULTATI

Di seguito è riportata la riduzione logaritmica media dei provini per ogni programma di lavaggio.

Programma di Lavaggio	Attrezzatura di Lavaggio	Inoculo Batteri (Log.10)		Specifica (Log.10)	Riduzione logaritmica dopo ciclo di lavaggio	
		E.hirae Atcc 10541 Sosp. Iniziale <u>8,10 Log</u>	E.coli Atcc 10536 Sosp. Iniziale <u>8,00 Log</u>		E.hirae Atcc 10541	E.coli Atcc 10536
Biancheria Albergo	Lavacontinua Fratelli Rosa 10 Kg	1,93	2,20	>5	6,17	5,80
Biancheria Delicata	Lavacentrifuga 80 Kg Bassa Temperatura 60°C	2,24	1,87	>5	5,86	6,13

Programma di Lavaggio	Attrezzatura di Lavaggio	Inoculo Miceti (Log.10)		Specifica (Log.10)	Riduzione logaritmica dopo ciclo di lavaggio	
		S.cerevisiae Sosp. Iniziale <u>Log 7,00</u>	A.brasiliensis ex niger Sosp. Iniziale <u>Log 7,10</u>		S.cerevisiae	A.brasiliensis ex niger
Biancheria Albergo	Lavacontinua Fratelli Rosa 10 Kg	1,97	2,04	>4	5,03	5,06
Biancheria Delicata	Lavacentrifuga 80 Kg Bassa Temperatura 60°C	1,72	1,97	>4	5,28	5,13

TESTING POINT 5 srl

c/o TECNOPOLO S.p.A. – Via di Castel Romano, 100 - 00128 Roma
 tel. +39.06.95227374 fax + 39.06.95227375 - e-mail: roma@retebiolab.com

P.IVA 09077751007

CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti, nelle condizioni sperimentali adottate, si può affermare che i cicli di lavaggio, effettuati presso la della **Lavanderia Industriale Stefani Via per Isorella, 15 – 25010 VISANO (BS)**, in data 17 Ottobre 2023, sono risultati:

EFFICACI

nel ridurre la contaminazione a carico dei batteri, dei lieviti, dei funghi e delle spore entro i limiti proposti dalla norma ISO 14698-1:2003 appendice E punto E.2.7. e dalla norma G 07 -172 Juillet 1992 Normalisation Francaise “Methode de controle et d’essai de la qualite hygienne du linge” .

TESTING POINT 5 srl

c/o TECNOPOLO S.p.A. – Via di Castel Romano, 100 - 00128 Roma
tel. +39.06.95227374 fax + 39.06.95227375 - e-mail: roma@retebiolab.com

P.IVA 09077751007

VALIDAZIONE PROCESSO DI DI LAVAGGIO

- APPENDICI -

TESTING POINT 5 srl

c/o TECNOPOLO S.p.A. – Via di Castel Romano, 100 - 00128 Roma
tel. +39.06.95227374 fax + 39.06.95227375 - e-mail: roma@retebiolab.com

P.IVA 09077751007

APPENDICE N. 1a: Calcolo della validità delle prove

Inoculo Escherichia coli ATCC 10536

Controlli - Inoculo Escherichia Coli ATCC 10536	calcolo	Biancheria Lavacontinua Albergo F.lli Rosa 10 Kg	Biancheria Delicata Lavacentrifuga Bassa Temperatura 60 °C
Controllo A	$N = \frac{150+148}{2}$	149	150
Controllo B	N1= 1100 U.V N2= 150 U.V	148	147
Controllo C	$\frac{n_1+n_2}{2} = n$	128	130

Inoculo Enterococcus Hirae ATCC 10541

Controlli - Inoculo Enterococcus hirae ATCC 10541	calcolo	Biancheria Lavacontinua Albergo F.lli Rosa 10 Kg	Biancheria Delicata Lavacentrifug a Bassa Temperatura 60 °C
Controllo A	$N = \frac{122+125}{2}$	123	122
Controllo B	N1= 1200 U.V N2= 120 U.V	120	119
Controllo C	$\frac{n_1+n_2}{2} = n$	120	121

TESTING POINT 5 srl

c/o TECNOPOLO S.p.A. – Via di Castel Romano, 100 - 00128 Roma
 tel. +39.06.95227374 fax + 39.06.95227375 - e-mail: roma@retebiolab.com

P.IVA 09077751007

Inoculo *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

Controlli - Inoculo <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	calcolo	Biancheria Lavacontinua Albergo F.lli Rosa 10 Kg	Biancheria Delicata Lavacentrifug a Bassa Temperatura 60 °C
Controllo A	$N = \frac{140+144}{2}$	142	143
Controllo B	N1= 1700 U.V N2= 140 U.V	140	139
Controllo C	$\frac{n_1 + n_2}{2} = n$	142	143

Sulla base dei risultati $N \approx N_2 \approx n$ pertanto la prova è da considerarsi valida

Inoculo *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080

Controlli - Inoculo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080	calcolo	Biancheria Lavacontinua Albergo F.lli Rosa 10 Kg	Biancheria Delicata Lavacentrifug a Bassa Temperatura 60 °C
Controllo A	$N = \frac{170+178}{2}$	174	172
Controllo B	N1= 1100 U.V N2= 170 U.V	170	169
Controllo C	$\frac{n_1 + n_2}{2} = n$	163	168

TESTING POINT 5 srl

c/o TECNOPOLO S.p.A. – Via di Castel Romano, 100 - 00128 Roma
 tel. +39.06.95227374 fax + 39.06.95227375 - e-mail: roma@retebiolab.com

P.IVA 09077751007