

# Proposta di nuovi indicatori di igiene ambientale

## Riassunto

Nel lavoro vengono proposti nuovi indicatori di igiene ambientale utili a superare l'attuale assenza in letteratura e nella pratica quotidiana di procedure e parametri in grado di descrivere l'efficacia dei protocolli di sanificazione di strutture ospedaliere. Sulla base delle sperimentazioni di campo effettuate utilizzando prodotti probiotici nella pulizia delle superfici nosocomiali, si propone di misurare tale efficacia introducendo, come criterio di accettabilità di una qualunque procedura sanificante, una scala numerica che fissa il massimo numero di microrganismi potenzialmente patogeni residenti per unità di superficie a 7 ore dalla applicazione del protocollo di sanificazione.

**Alberta Vandini\***, **Paola Antoniol\*\***, **Luca Lanzoni\***,  
**Maria Teresa Camerada\***, **Pier Giorgio Balboni\***,  
**Maddalena Coccagna\***, **Sante Mazzacane\***

\* CIAS, Centro studi Inquinamento Ambienti elevata Sterilità, Centro di ricerca interdipartimentale Dipartimento di Architettura e Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Ferrara

\*\* Azienda Ospedaliero Universitaria di Ferrara, Struttura Dipartimentale di Igiene Ospedaliera e Qualità dei Servizi Ambientali, Ferrara

## PAROLE CHIAVE:

Contaminazione, disinfettanti chimici, probiotici, sanificazione, degenze ospedaliere

## INTRODUZIONE

La contaminazione microbica viene comunemente valutata utilizzando metodi basati sull'analisi, mediante conteggio delle UFC per unità di superficie, di piastre da contatto o RODAC™ (*Replicate Organism Detection and Counting*), contenenti terreno solido selettivo o per crescita non specifica.

In letteratura è consolidato l'utilizzo dell'indice I.M.S. di Pitzurra (indice microbico di superficie), che rappresenta il valore della contaminazione totale (UFC/cm<sup>2</sup>) per le sale operatorie.

Tale indice è rappresentativo, tuttavia, dello stato di contaminazione di una superficie negli istanti immediatamente successivi ad un trattamento di sanificazione (30 minuti dopo), inteso questo come disinfezione (chimica) delle superfici di interesse, ovvero come abbattimento della carica microbiologica indistinta, riferita a tutti i microrganismi e non solo a quelli potenzialmente patogeni.

Questo parametro, tuttavia, mal si presta alla valutazione dei risultati prima esposti.

In primo luogo, mentre le sale operatorie sono da considerarsi

ambienti ad elevato rischio infettivo, in cui è prevista l'assenza pressoché totale di carica batterica, non altrettanto si può dire per un reparto di degenza o per un Poliambulatorio.

In secondo luogo, una volta sanificate le superfici di una sala operatoria, l'ambiente viene compartimentato e climatizzato con filtrazione assoluta. I processi di ricontaminazione che avvengono sono unicamente imputabili alla crescita naturale dei microrganismi eventualmente sopravvissuti alla disinfezione ed in misura molto limitata alla ricontaminazione.

Al contrario, nelle degenze l'aumento della carica microbica è riconducibile soprattutto ai fenomeni di ricontaminazione dovuti a persone e materiali che fungono da veicolo ed ai fenomeni di sedimentazione gravitazionale del pulviscolo atmosferico.

In terzo luogo, sempre per le degenze ospedaliere, non è utile stabilire un valore di soglia massima di contaminazione, negli intervalli temporali immediatamente successivi all'atto della pulizia, poiché i processi di crescita dei microrganismi hanno natura dinamica e comportano un aumento esponenziale della conta batterica anche nell'arco di alcune ore.

La valutazione della contaminazione superficiale mediante l'impiego del metodo della conta totale dei microrganismi (UFC) non è quindi per nulla descrittiva dell'effettivo rischio di contrarre infezioni da parte del paziente.

Nel caso dell'impiego dei probiotici, la popolazione microbica, che si consolida sulle superfici sanificate

Tabella 1– Andamento della carica microbica nel tempo (Ospedale S. Anna)

UFC/m <sup>2</sup>	Prot.tradiz. (*) 30 min dopo sanif.	Prot.tradiz. (*) 7 ore dopo sanif.	Prot. Probio. (**) 7 ore dopo sanif.	Prot.probio. (**) 24 ore dopo sanif.
St. aureus	5.460	9.750	1.470	3.050
E.coli	941	2.301	460	1.160
Pseudomonas spp.	439	929	121	482
C.albicans	431	1.513	378	627

(\*) a base di prodotti chimici – (\*\*) a base di probiotici

con prodotti probiotici, è per lo più costituita da *Bacillus spp.*, considerati sicuri per la salute umana e, solo in minima parte, è costituita da altre specie batteriche.

Pertanto è conveniente utilizzare sempre il metodo del conteggio delle UFC per unità di superficie (UFC/m<sup>2</sup>), ma ricavandolo per singolo microrganismo potenzialmente patogeno.

Poiché la carica batterica varia con il passare del tempo, è conveniente, inoltre, che i campionamenti microbiologici siano effettuati a circa 7 ore di distanza dalla sanificazione. Infatti, i dati esposti in Tabella 1 sono stati ottenuti in seguito alle indagini effettuate, confrontando i risultati rilevati in momenti diversi della giornata:

Si osserva, a questo proposito, che per il protocollo chimico, dopo circa 7 ore le UFC/m<sup>2</sup> grossomodo raddoppiano rispetto agli istanti immediatamente successivi alla disinfezione; per quanto riguarda il trattamento con probiotici, le UFC/m<sup>2</sup> raddoppiano o triplicano (per effetto dei fenomeni di ricontaminazione), passando da 7 ore successive al trattamento a 24 ore dopo il medesimo, quindi con una cinetica decisamente inferiore rispetto al caso precedente.

Allo stato attuale, il dato di maggiore interesse risiede comunque nel fatto che, a distanza di 24 ore dall'intervento di pulizia, la contaminazione con protocollo probiotico PCHS risulta addirittura la metà

o un terzo di quella che si ottiene con la disinfezione chimica negli istanti successivi alla pulizia stessa. Inoltre l'ampiezza di oscillazione dei valori nel caso dei probiotici è molto più ridotta rispetto al protocollo alternativo e quindi, si produce sul campo un effetto di *bio-stabilizzazione* dei potenziali patogeni.

### PROPOSTA DI UN NUOVO INDICATORE DI VALUTAZIONE DELL'IGIENE AMBIENTALE

E' evidente che, indipendentemente dalle modalità con cui viene espletata, la sanificazione ospedaliera è un processo di tipo industriale, e quindi alla medesima deve essere associata una metodologia di verifica su campo dei risultati ottenuti, con la conseguente individuazione di una scala di valori e di criteri di accettabilità degli *outcomes* finali. Si ritiene pertanto metodologicamente opportuno proporre in questa sede l'introduzione di un Indice di Qualità Microbiologica (IQM) per la misura del livello di igiene delle degenze ospedaliere, con la esclusione delle aree classificate ad alto rischio e delle sale operatorie.

Le caratteristiche della scala di misura sono le seguenti:

■ le UFC/m<sup>2</sup> rappresentano l'unità di misura assunta a campione, i valori rilevati risultano più chia-

ramente elaborabili utilizzando questo ordine di grandezza. Si ritiene comunque possibile, sulla base degli sviluppi della ricerca e ed ai fini del monitoraggio microbiologico, proporre l'utilizzo dell'indicatore l'IQM con unità UFC/dm<sup>2</sup>.

■ il rilevamento della contaminazione superficiale viene effettuato mediante piastre Rodac, addizionate a opportuni terreni selettivi;

■ le piastre devono essere appoggiate sulla superficie da campionare e su di esse viene esercitata una leggera pressione per 30 sec;

■ i campionamenti devono essere effettuati almeno in doppio, possibilmente in triplo, e le piastre, una volta incubate e lette secondo le correnti normative UNI, devono essere fotografate ed archiviate prima del loro smaltimento;

■ le superfici oggetto di campionamento, su cui vengono applicati i prodotti probiotici sono sia quelle a contatto diretto con il paziente (comodino, testata del letto, sanitari etc..) sia quelle a contatto indiretto (pavimento degenza, pavimento corridoio reparto nelle zone di massimo passaggio, pavimento bagno);

■ devono essere monitorate le UFC/m<sup>2</sup> dei singoli patogeni, quali *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas species*, coliformi (compreso *Escherichia coli*), *Candida albicans*, *Acinetobacter spp.*,

Microrganismi ricercati	Valori IQM dopo circa 7 ore dalle operazioni di sanificazione
<i>S.aureus</i>	< 1.000 UFC/m <sup>2</sup>
<i>Pseudomonas spp.</i>	< 500 UFC/m <sup>2</sup>
Coliformi totali	< 500 UFC/m <sup>2</sup>
<i>Candida spp.</i>	< 1.000 UFC/m <sup>2</sup>
<i>Clostridium d.</i>	< 2.000 UFC/m <sup>2</sup>

Tabella 2 - Scala di accettabilità dell'Indice di Qualità Microbica IQM

*Clostridium spp.* Lo sviluppo della ricerca in corso porterà alla definizione di indice IQM anche per altri microrganismi.

- devono essere monitorate anche le UFC/m<sup>2</sup> della carica totale, ciò al fine di poter identificare, nel caso di impiego del protocollo con probiotici, la presenza dei *Bacillus spp.*, a scopo di controllo della corretta applicazione del prodotto;

- i campionamenti devono essere effettuati a 7 ore circa dopo la sanificazione prima del ripasso quotidiano;

- il numero di campionamenti deve poter permettere il raggiungimento di un risultato statisticamente significativo.

E' stato possibile individuare una scala di valori di accettabilità delle procedure di sanificazione di seguito riportato in Tabella 2.

Il principio cardine che si propone in questa sede consiste nel fatto che, indipendentemente dal tipo di protocollo scelto, si utilizzi un metodo unico, condiviso e oggettivo di valutazione della efficacia del trattamento, al fine di introdurre un metodo di misura dei risultati ottenuti. Questo metodo individua i valori numerici dell'Indice di Qualità Microbica (IQM), che rappresentano i valori massimi di contaminazione di una superficie da parte degli specifici microrganismi potenzialmente patogeni di interesse nella microbiologia nosocomiale. I valori soglia proposti dall'Indice IQM

sono stati ottenuti dall'insieme dei numerosissimi campionamenti svolti durante l'arco della ricerca e tutt'ora in corso. I dati sono stati divisi per singolo patogeno e su ognuno di questi è stata calcolata la distribuzione media di Poisson con intervallo di confidenza al 95° percentile (p<0,95) e 5° percentile (p>0,05). Come valori di soglia si propone di adottare quelli relativi al 95° percentile.

Di seguito viene descritta in dettaglio la metodologia di campionamento che si propone di seguire.

## MATERIALI E METODI

La modalità di esecuzione della ricerca ha compreso la verifica dell'efficacia dell'attività di competizione dei prodotti PCHS (*Probiotic Cleaning Hygien System*) sia mediante prove "in vitro", in condizioni standard ed in assenza di variabili esterne, sia "su campo" in ambienti ospedalieri al fine di avere condizioni critiche, causate dalla continua ricontaminazione delle superfici trattate con PCHS e sottoposte a monitoraggio.

La metodica analitica utilizzata per le verifiche microbiologiche "in vitro" è stata la norma standard UNI EN 13697:2001, la quale si basa su un metodo di prova quantitativo per superfici non porose per la valutazione dell'attività battericida e/o fungicida di disinfettanti chimici (fase 2/ stadio 2). È stato utilizzato questo metodo, in quan-

to non vi sono normative di riferimento per valutare l'attività di biostabilizzazione basate su prodotti probiotici. Il campionamento delle superfici "in campo" è stata effettuata secondo la Linea Guida CONTARP-INAIL:2005, la norma UNI EN ISO 14698:2004 e la Linea guida ISPELS: 2009 riguardante sia la procedura di campionamento delle superfici che le analisi microbiologiche.

In laboratorio i metodi dell'analisi microbiologica sono stati eseguiti in base alla Linea guida ISPELS: 2009 e alle norme di buona prassi di laboratorio secondo le Linee Guida *Good Manufacturing Practice* (GMP). Il materiale utilizzato per i campionamenti è stato acquistato da Fornitori qualificati che hanno garantito il *Quality Control* (QC) di ogni lotto in conformità alle Linee Guida "Microbiological Quality criteria according to European Pharmacopeia" e inviato il CERTIFICATO DI QUALITÀ di ogni lotto, compreso i test di convalida di sterilità (Sterility Test) e di fertilità (Fertility Test).

## Parametri microbiologici

I parametri microbiologici, rappresentati dai ceppi batterici potenzialmente patogeni che maggiormente sono diffusi negli ambienti ospedalieri, e responsabili della quasi totalità delle infezioni ospedaliere, sono i seguenti:

a. Carica microbica totale (corrispondente al valore della carica batterica e fungina totale delle superfici campionate (= TVC).

b. *Staphylococcus species (spp.)*, in particolare *Staphylococcus aureus*,

c. *Enterobacteriaceae*, in generale definiti Coliformi, compreso il patogeno opportunisto *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* e *Proteus mirabilis*, importanti in quanto molto diffusi e caratterizzati da multi resistenze agli antibiotici.

d. *Pseudomonas species (spp.)*,

e. *Candida spp.*

## TECNICA PLATE COUNT

Tecnica Plate Count utilizza piastre da contatto Rodac da 55 mm di diametro (Figura 1).

Per rilevare la carica microbica totale aerobica (TVC) ed i microorganismi patogeni, sono state utilizzate piastre Rodac con terreno addizionato di Lecitina, Istidina e Tween, neutralizzanti per inibire l'eventuale presenza sulle superfici di residui di sostanze ad attività disinfettante o antibatterica.

Le tipologie di terreno di coltura agarizzato sono le seguenti:

- 1-Rodac TSA per la conta microbica totale (TVC)
- 2-Rodac BAIRD PARKER (o MANNITOL SALT AGAR) per *Staphylococcus spp.*
- 3-Rodac MacCONKEY AGAR per *Enterobacteriaceae* (*Enterobatteri*, *Escherichia coli*, ecc.)
- 4-Rodac CETRIMIDE AGAR per *Pseudomonas spp.*
- 5-Rodac SABOURAUD AGAR + CFL per *Candida spp.*

## PROCEDURA DI PRELIEVO MICROBIOLOGICO

Il prelievo microbiologico durante la fase di ricerca è stato svolto sia in triplo che in doppio; in seguito ai risultati ottenuti si ritiene pertanto di proporre di svolgere il campionamento almeno in doppio per ottenere una maggiore significatività statistica; i valori media saranno inoltre espressi in UCF (*Colony Forming Units*) /m<sup>2</sup>.

**PROCEDURA DI PRELIEVO:** la parte convessa delle piastre Rodac deve essere appoggiata sulla superficie da monitorare; su di essa viene poi esercitata una pressione costante ed omogenea per 30 secondi.

Durante il prelievo è opportuno evitare movimenti circolari o li-

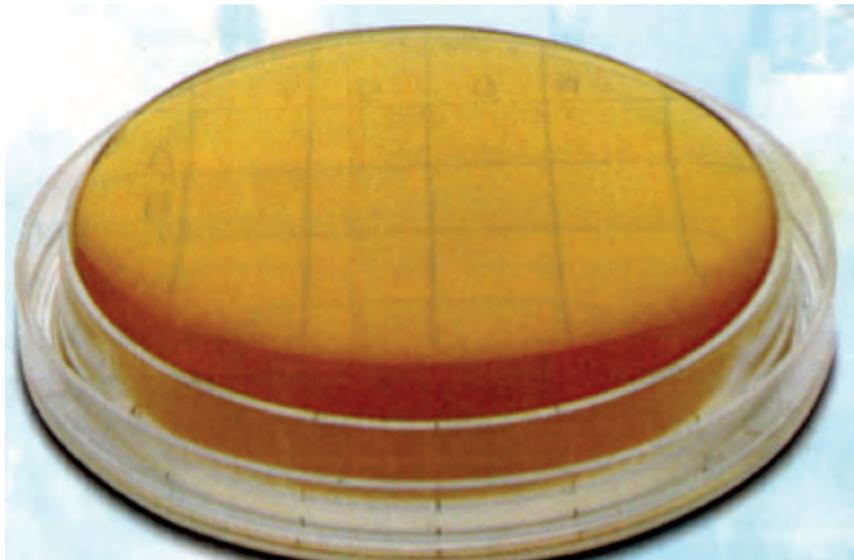


Figura 1 - PIASTRE RODAC™ [Replicate Organism Direct Agar Contact]: diametro di 55 mm corrispondente ad una superficie di contatto di 24 cm<sup>2</sup>.



Figura 2 - Durante il prelievo la superficie convessa della piastra Rodac deve essere adesa alla superficie.

neari ed eseguire strofinamenti per non danneggiare l'agar. Mentre è possibile effettuare un movimento a bilanciere in caso di superfici convesse, come ad

esempio durante il prelievo su maniglie o corrimano. Inoltre le piastre devono essere posizionate ed allineate secondo quanto mostrato nelle Figure 3, 4 e 5.

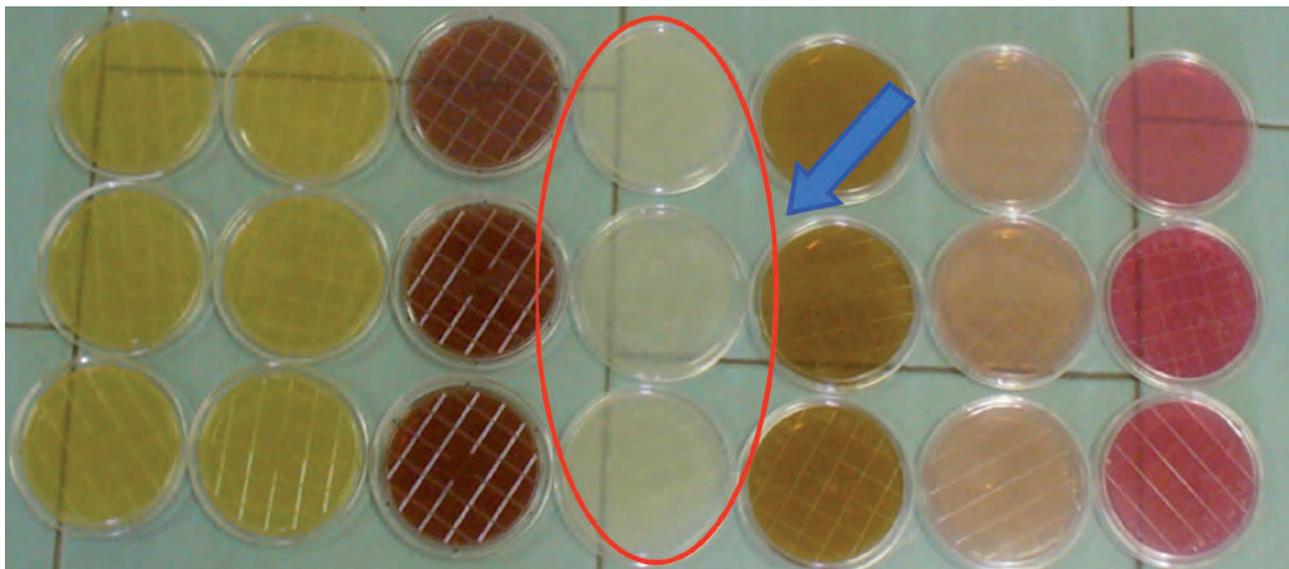


Figura 3 - Allineamenti possibili durante il posizionamento delle piastre Rodac su una superficie orizzontale (ad esempio pavimento).

### TRASPORTO IN LABORATORIO:

Dopo il campionamento, preferibilmente entro 4 ore, le piastre Rodac vengono trasportate e conservate in termostato ad una temperatura compresa tra 15 - 20 °C.

### INCUBAZIONE:

Dopo il prelievo ogni Rodac è stata posta in termostato:

- a 37°C per 48 - 72 ore per valutare la crescita batterica;
- a 25°C per altre 72 - 96 ore per verificare la crescita dei lieviti *Candida spp.*.

Al termine del periodo di incubazione, vengono contate le colonie che si sono sviluppate sulla superficie della piastra Rodac, i cui valori sono espressi in Unità Formanti Colonia (UFC).

Un conteggio accurato si esegue solo sulle piastre nella quali non siano cresciute più di 200 colonie.

In caso di piastre non numerabili, si esprime il risultato con  $\geq 200$  UFC/piastra.

Infine vengono calcolati i valori di media riferiti alla superficie della piastra a contatto *Contact Plate* (Rodac) di 24 cm<sup>2</sup>. Ogni risultato deve essere rapportato all'unità di superficie (1 m<sup>2</sup>).

### ESPRESSIONE DEI RISULTATI MICROBIOLOGICI:

Il calcolo delle unità vitali viene effettuato come media matematica dei valori ottenuti per ciascun campionamento. Il risultato della conta per ciascuna piastra viene quindi diviso per 24 e moltiplicato per 10.000, al fine di ottenere l'unità di misura desiderata (UFC/m<sup>2</sup>).

### DESCRIZIONE DEI TERRENI DI COLTURA MICROBIOLOGICI:

Il Triptyc Soy Agar (TSA) impiegato



Figura 4 - Allineamento durante il posizionamento delle piastre Rodac su una superficie non orizzontale (ad esempio lavello): le Rodac sono allineate in fila.



Figura 5 - Posizionamento delle piastre Rodac su una superficie non orizzontale (ad esempio lavello): le Rodac sono poste vicine a tripletta.

Ceppo microbico	Condizioni di coltura	Caratteristiche di crescita
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	37 ± 1°C	Dimensioni medie, colonie leggermente giallastre
<i>Micrococcus</i> spp.	37 ± 1°C	Piccole colonie bianche
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	37 ± 1°C	Dimensioni grandi, colonie leggermente giallastre
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	37 ± 1°C	Dimensioni medie, colonie leggermente giallastre
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	37 ± 1°C	Grandi colonie piatte e secche, di forma irregolare
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	25 ± 1°C	Piccolo colonie bianche secche
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	25 ± 1°C	Colonie con micelio chiaro

Tabella 3 - Condizioni di coltura e caratteristiche di crescita dei ceppi microbici

per la coltura e l'isolamento di tutti i batteri, lieviti e muffe, ha una composizione conforme a quanto indicato nella farmacopea europea (EP) e statunitense (USP). Aggiunto con agenti definiti attivanti, quali Lecitina, Tween 80 e Istidina, in grado di neutralizzare eventuali residui di detergente o di disinfettante, il terreno TSA è utilizzato per il monitoraggio ambientale (Hygiene Monitoring \_Environmental Monitoring) delle superfici, del personale (mani, vestiario) e dell'aria.

La combinazione dei peptoni di caseina e soia fornisce aminoacidi essenziali, peptidi a basso peso molecolare e proteine solubili, per favorire la crescita dei microrganismi. I carboidrati derivati da peptoni di soia favoriscono la crescita di lieviti e muffe. Il terreno è indicato per la coltivazione di microrganismi sia aerobi che anaerobi.

Gli inattivanti aggiunti al terreno TSA presentano le seguenti funzioni:

- la lecitina neutralizza i composti di ammonio quaternario e di paraidrossibenzoato (Sutton et al.);
- il Tween 80 inattiva i fenoli (Russel et al.)
- l'istidina inattiva la formaldeide e i derivati formaldeidici (Wallhäuser).

Condizioni di incubazione:

Le piastre TSA, dopo il monitoraggio, vanno incubate in termostato da 20 a 25 ° C, per un intervallo di tempo compreso tra 5 a 7 giorni, per la rilevazione di lieviti e muffe; a 30 a 35 ° C per la rilevazione di

batteri ( cfr. Guidance for Industry), fra cui anche i *Bacillus* che appaiono nelle Figure 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12. Nella Tabella 3, per i microrganismi più significativi, sono riportate le condizioni di temperatura a cui si sviluppano e la loro morfologia.



Figura 6 - Colonie di *Bacillus* spp.



Figura 7 - Colonie di *Bacillus* spp.



Figura 8 - Colonie di *Bacillus* spp.



Figura 9 - Colonie di *Bacillus* spp.



Figura 10 - Colonie di *Bacillus spp.*

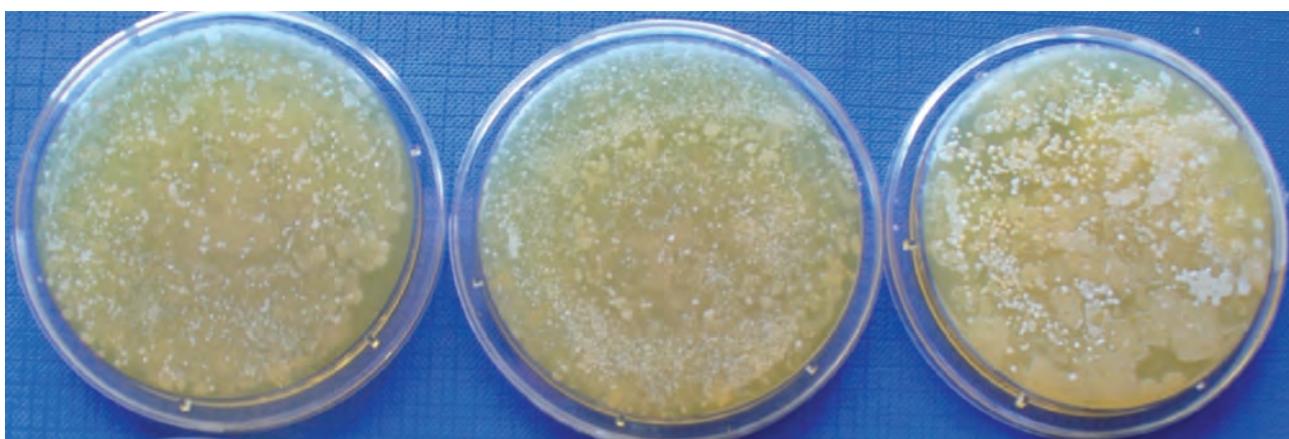


Figura 11 - Colonie di *Bacillus spp.*

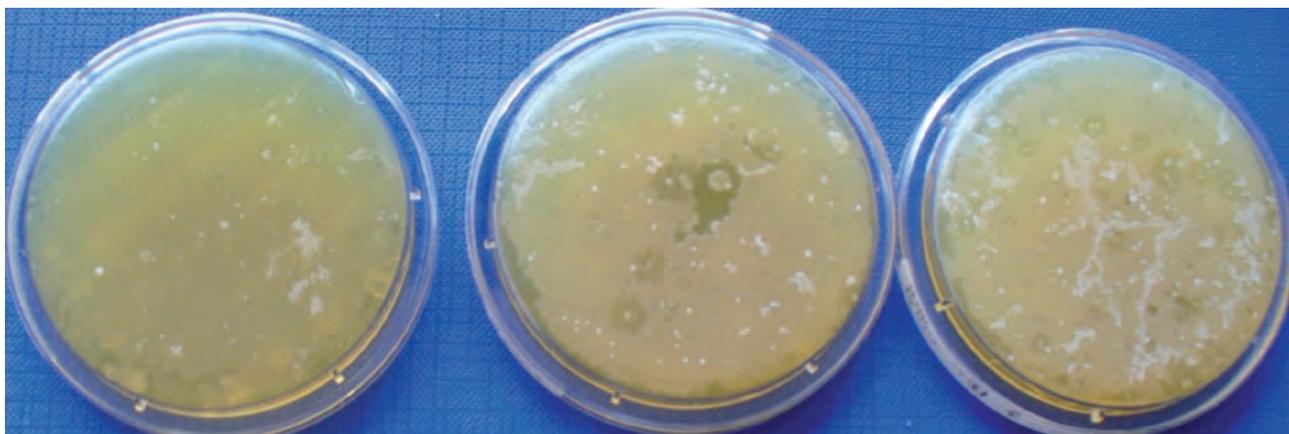


Figura 12 - Colonie di *Bacillus spp.*

### **MANNITOL SALT AGAR: AGAR MS**

Si tratta di un terreno selettivo e diagnostico per l'isolamento e la conta di *Staphylococcus aureus* (Figura 13, 14, 15), contenente una elevata concentrazione di NaCl, in funzione di agente se-

lettivo per inibire la crescita della maggior parte dei batteri, ad eccezione dello *Staphylococcus aureus*.

Il mannitolo rende questo terreno differenziale.

**MANNITOL SALT AGAR:** è un terreno di coltura che inibisce la maggior parte dei batteri, in

quanto possiede percentuali di cloruro di sodio molto elevate (75-100 grammi per litro), favorendo la crescita degli Stafilococchi che sono batteri alofili. La fermentazione del mannitolo produce acidi e la conseguente variazione di pH, e quindi un viraggio dell'indicatore presente nel

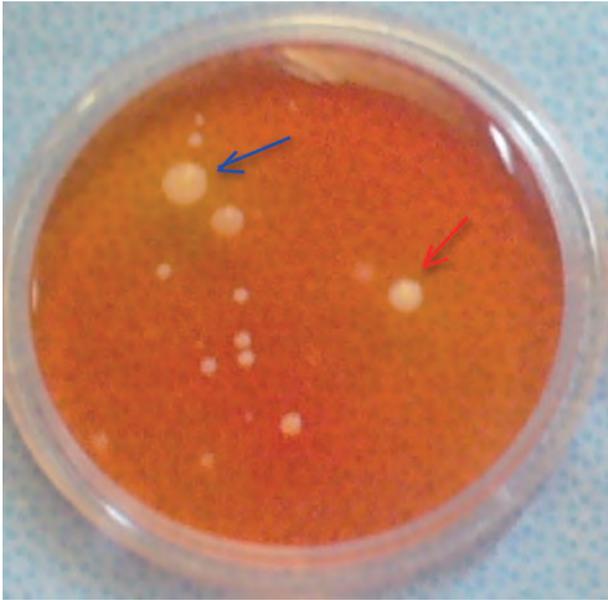


Figura 13 - Rodac con terreno MANNITOL SALT AGAR .  
 Colonie di *Stafilococcus coagulasi* positiva con alone giallo, presunta colonia di *Stafilococcus aureus*. MANNITOL SALT AGAR: Colonie piccole gialla pallido: colonie di *Stafilococcus aureus* coagulasi positiva (freccia **rossa**).  
 Le colonie beige grandi / piccole sono *Bacillus* spp. (freccia **blu**).



Figura 14 - Rodac con terreno MANNITOL SALT AGAR .  
 Colonie piccole gialle: colonie di cocchi *Staphylococcus* species (spp.) coagulasi negativi (freccia **gialla**).  
 Le colonie beige grandi / piccole sono *Bacillus* spp. (freccia **blu**).

Rodac 1 con terreno MANNITOL SALT AGAR .

Rodac 2 con terreno MANNITOL SALT AGAR .

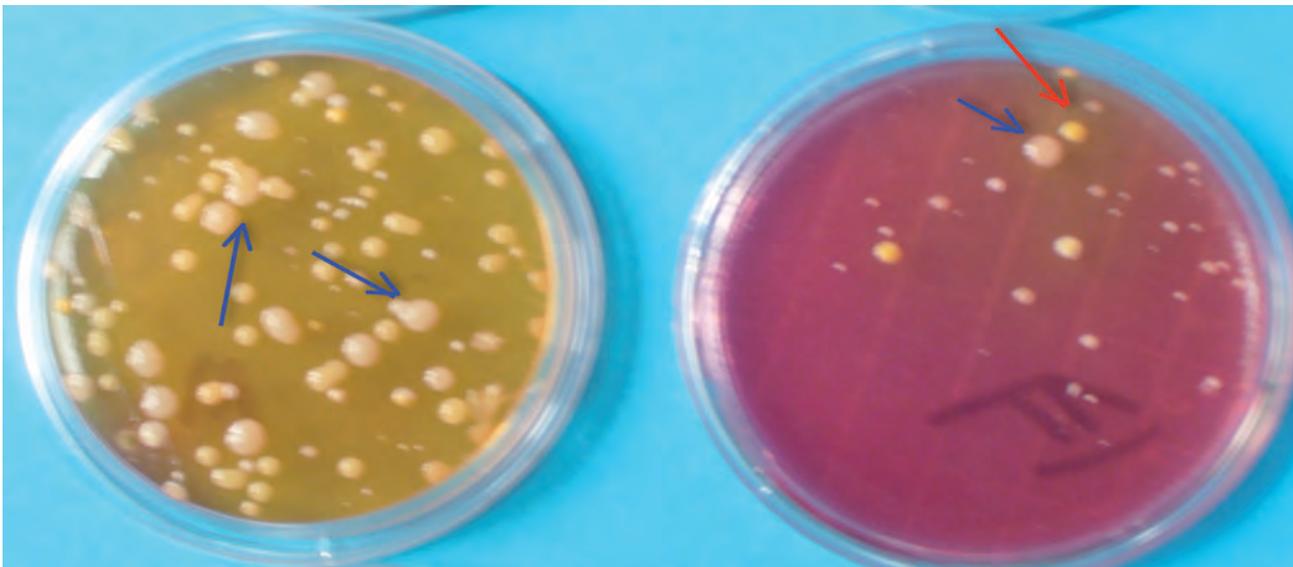


Figura 15 - Rodac 1 con terreno MANNITOL SALT AGAR: Le colonie beige più grandi sono *Bacillus* spp.  
 Rodac 2 con terreno MANNITOL SALT AGAR: Colonie piccole gialla pallido: colonie di *Staphylococcus aureus* coagulasi positiva freccia **rossa**). Le colonie beige grandi / piccole sono *Bacillus* spp. (freccia **blu**)

terreno (rosso fenolo) da rosso a giallo. L'agar sale mannitolo è un terreno sia selettivo (cioè permette la crescita solo di alcune specie) che differenziale, riuscendo a discriminare una specie dall'altra grazie ad indicatori.

#### BAIRD PARKER AGAR:

Si tratta di un terreno differenziale, moderatamente selettivo, per l'isolamento e la conta di *Staphylococcus aureus* (Figura 16 (a, b), 17). Contiene degli agenti selettivi, quali

glicina, litio e tellurito, per inibire la crescita della maggior parte dei batteri, ad eccezione di *Staphylococcus aureus*. Il Baird-Parker contiene piruvato di sodio, per recuperare gli eventuali *Stafilococchi* danneggiati dai processi di sanificazione.

La maggior parte dei ceppi di *Staphylococcus aureus* forma degli aloni trasparenti chiari intorno alle colonie, probabilmente a causa dell'azione di una lipasi. Gli *Staphylococcus species* (spp.) sono batteri a forma di cocci a grappolo, Gram positivi, presenti sulla cute e nelle secrezioni umane.

Al genere *Staphylococcus spp.*, soprattutto *St. epidermidis*, appartengono saprofiti normalmente presente sulla cute umana. Nelle Figure 16, 17, 18, 19 e 20 è possibile osservare colonie di *Staphylococcus aureus* e di *Bacillus* che si sono formate.

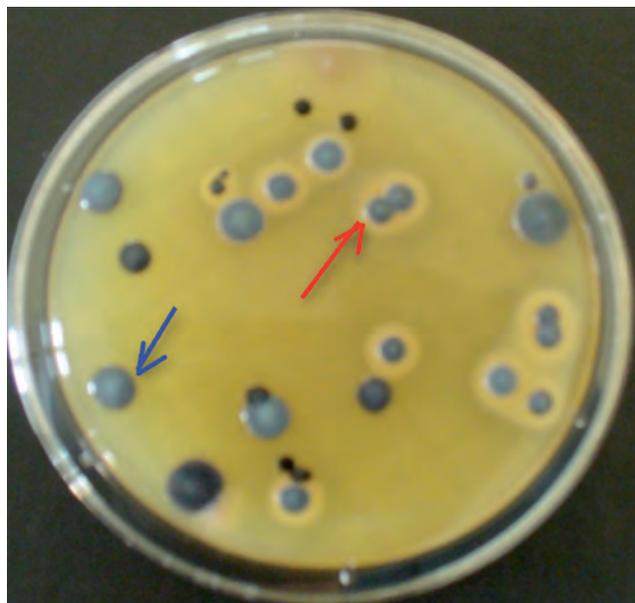


Figura 16 (a) - Rodac con terreno BAIRD PARKER AGAR  
Colonie di *Staphylococcus* coagulasi positiva con alone trasparente chiaro, probabile al 70% circa presenza di *Staphylococcus aureus*.

Colonie di *Staphylococcus aureus* coagulasi positiva (freccia **rossa**).

Le colonie beige grandi / piccole sono *Bacillus* spp. (freccia **blu**).

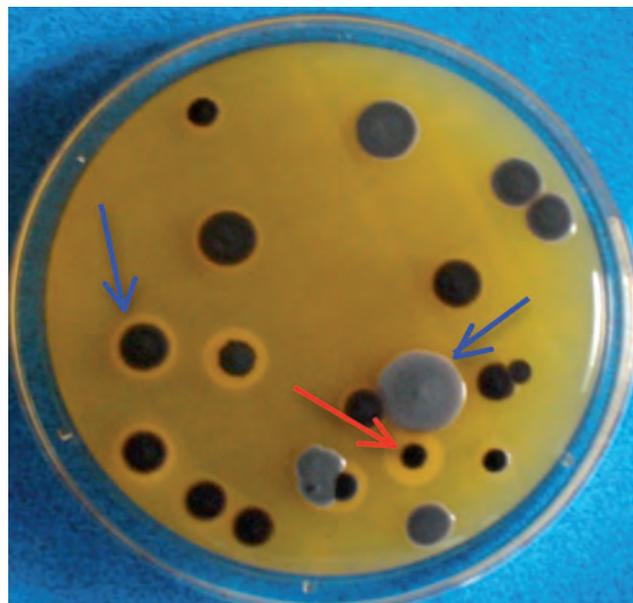


Figura 16 (b) - Rodac con terreno BAIRD PARKER AGAR: Colonie di *Staphylococcus* coagulasi positiva con alone trasparente chiaro, probabile al 70% circa presenza di *Staphylococcus aureus*. Le colonie grigio chiaro grandi sono *Bacillus* spp.

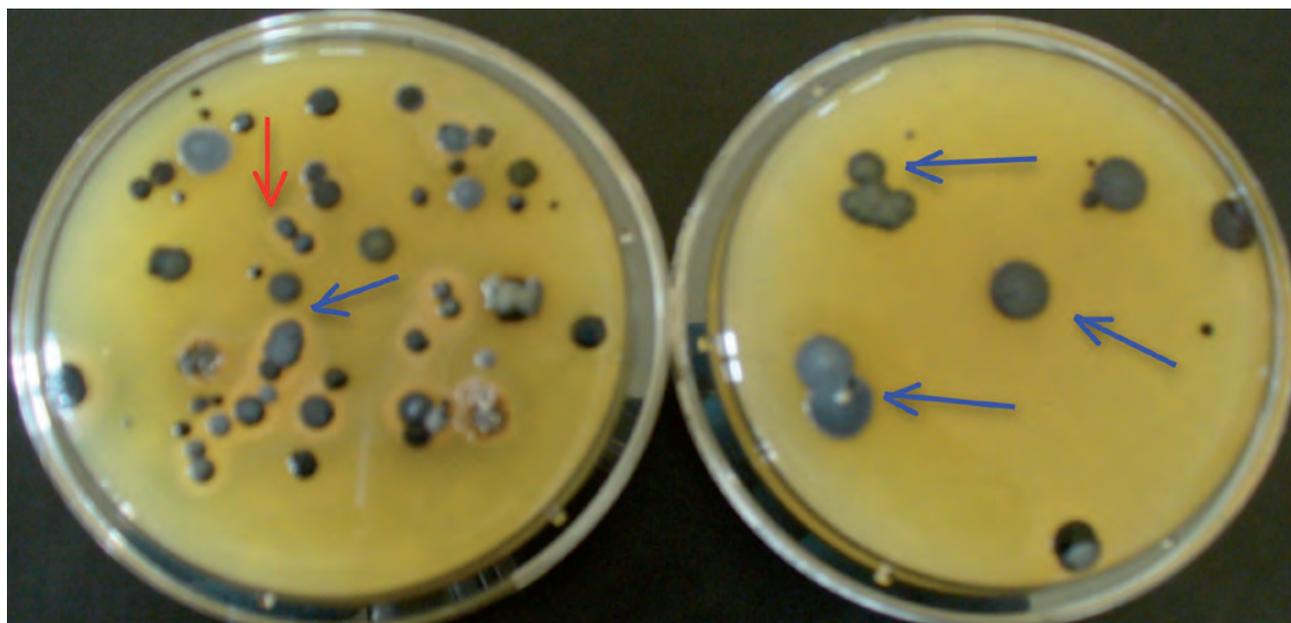


Figura 17 - Rodac con terreno BAIRD PARKER AGAR: Colonie di *Staphylococcus* coagulasi positiva con alone trasparente chiaro, probabile al 70% circa presenza di *Staphylococcus aureus*. Le colonie grigio chiaro grandi o a contorni irregolari sono *Bacillus* spp. Colonie di *Staphylococcus aureus* coagulasi positiva (freccia **rossa**).

Le colonie beige grandi / piccole sono *Bacillus* spp. (freccia **blu**)

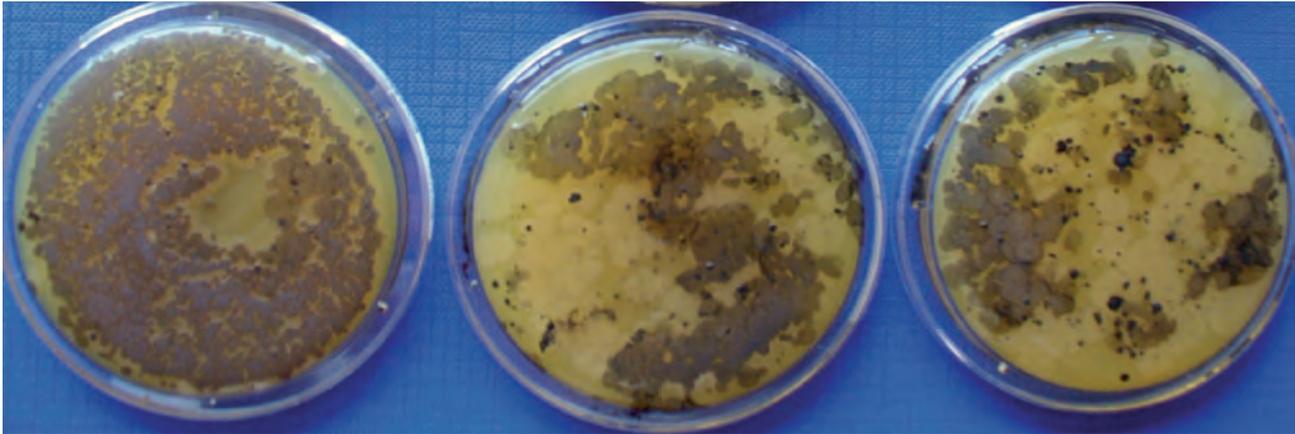


Figura 18 - Le colonie grigio chiaro grandi o a contorni irregolari sono *Bacillus spp.*

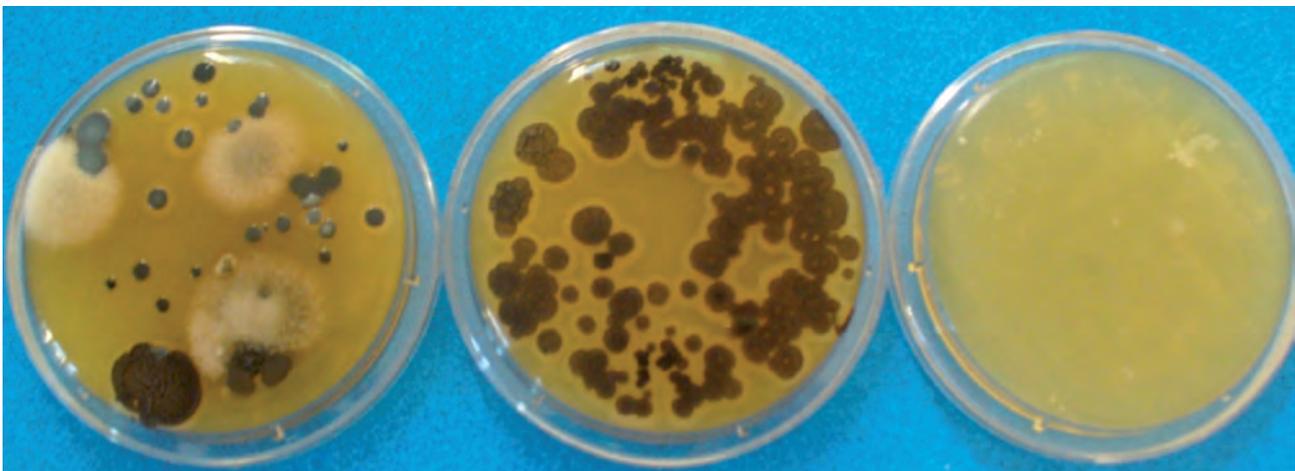


Figura 19 - Le colonie grigio chiaro grandi o a contorni irregolari sono *Bacillus spp.*



Figura 20 - Le colonie grigio chiaro grandi increspate o a contorni irregolari sono *Bacillus spp.*

### MAC CONKEY AGAR:

E' un terreno differenziale per l'identificazione presuntiva di Gram negativi appartenenti al ge-

nera *Enterobacteriaceae* (Figura 21 e Figura 22) e nello specifico Enterobatteri produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro, compreso il patogeno opportunisto

*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* e *Proteus mirabilis*, importanti in quanto molto diffusi e caratterizzati da multi resistenze agli antibiotici.

**MAC CONKEY AGAR:** contiene sali biliari e cristal violetto come agenti selettivi, lattosio ed un indicatore di pH, il rosso neutro, come agenti differenziali. Il rosso neutro è un indicatore che a valori prossimi alla neutralità è leggermente rosato, a valori acidi è rosso, a valori alcalini è incolore. Le colonie di *E. coli* risultano di colore rosso-viola. L' *E. coli* fermentano il lattosio dando colonie circondate da un alone di sali biliari precipitati, reazione dovuta all'azione degli acidi prodotti dalla fermentazione del lattosio sui sali biliari ed il successivo assorbimento del rosso neutro. Le colonie di *E. coli* si presentano piccole rotondeggianti, lisce, cremose.

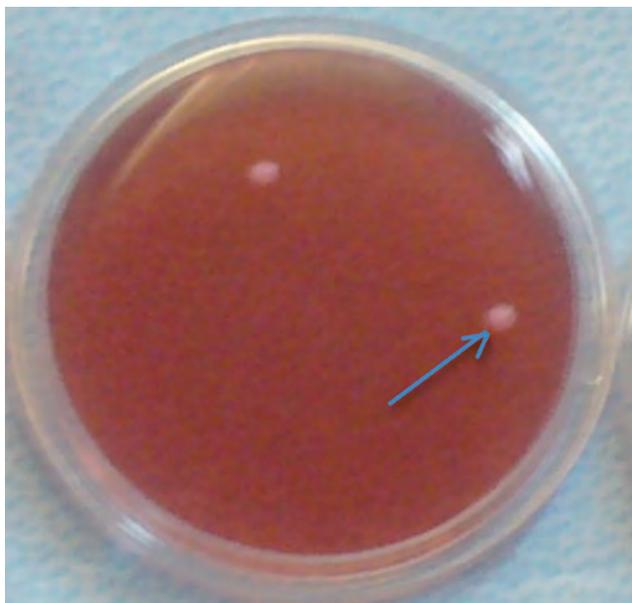


Figura 21 - Rodac con terreno MAC CONKEY AGAR. Colonie colore rosso: Enterobacteriaceae



Figura 22: Rodac con terreno MAC CONKEY AGAR. Colonie colore rosa-gialle: *Klebsiella spp.*

### CETRIMIDE AGAR:

È un terreno selettivo (Figura 22) per l'identificazione presuntiva

di Gram negativi appartenenti al genere *Pseudomonas species* (compreso il patogeno *Pseudomonas aeruginosa*).

I *Pseudomonas spp.* sono batteri a forma di bacilli Gram negativi, diffusi e tipici ambientali;



**CETRIMIDE AGAR:** è un terreno nutritivo in grado di evidenziare la produzione di pigmento blu-verde. L'aggiunta di cetrimide conferisce la selettività favorendo la crescita abbondante di *Pseudomonas*. Le colonie di *Ps. aeruginosa* risultano di colore verde, la cui fluorescenza si evidenzia con la lampada di Wood.

***P. aeruginosa*** è in grado di produrre diversi pigmenti tra cui il più caratteristico è la pio-cianina. Le colonie sono grandi, mucose e a bordi frastagliati, perché lo *Ps.* è un batterio mobile.

Figura 23 - Rodac con terreno CETRIMIDE AGAR. Colonie con fluorescenza verde -giallo: *Pseudomonas spp.*

**SABOURAUD + CLORAMFENICOLO AGAR:**

è un terreno selettivo per l'identificazione presuntiva dei lieviti appartenenti al genere *Candida species* (compreso il lievito patogeno *Candida albicans*) (Figura 24). *Candida spp.* sono lieviti unicellulari e sono sia di derivazione ambientale che umana.

**SABOURAUD + CLORAMFENICOLO AGAR:** è un terreno selettivo per la crescita dei miceti a base di peptone micologico, che fornisce i fattori di crescita azotati e destrosio (20%), come fonte di carbonio a pH basso di  $5.6 \pm 0.2$ . L'elevata concentrazione di glucosio facilita la crescita dei miceti (Figura 25 e 26), inibendo parzialmente la maggior parte dei batteri. Il cloramfenicolo (CFL: 50/500 mg/ml) è l'antibiotico che rende il terreno selettivo inibendo la crescita di tutti i batteri. Le colonie di *Candida* si presentano rotondeggianti, lisce, cremose di un bianco candido ("albicans"= bianco) (Figura 27).

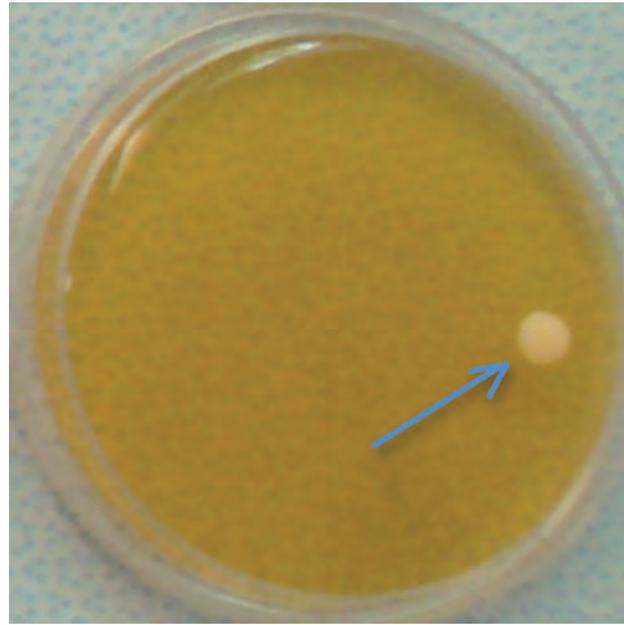


Figura 24: Rodac con terreno SAB+CLF AGAR. Colonia bianca cremosa: *Candida spp.*



Figura 25 - Rodac con terreno SAB+CLF AGAR. Colonie vellutate per la presenza del micelio fungino aereo di colore diverso colori a seconda della specie fungina.



Figura 26 - Rodac con terreno SAB+CLF AGAR. Colonie vellutate per la presenza del micelio fungino aereo di colore diverso colori a seconda della specie fungina.



Figura 27 - Rodac con terreno SAB+CLF AGAR. Colonie bianche cremose: *Candida spp.*

**BIBLIOGRAFIA**

1. Guidance for Industry: Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing - Current Good Manufacturing Practice. September 2004: Pharmaceutical CGMPs.
2. Levitt JM, Naidorf IJ, Shugaevsky P. The undetected anaerobe in endodontics; a sensitive medium for detection of both aerobes and anaerobes. The NY J. Dentist. 1955; 25: 377-382.
3. Russel AD, Ahonkhai I, Rogers DT. Microbiological Applications of the Inactivation of Antibiotics and Other Antimicrobial Agents. J. Appl. Bacteriology 1979; 46 (2): 207-245.
4. Sutton SVW, Proud DW, Rachui S, Brannan DK. Validation of microbial recovery from disinfectants. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 2002; 56; No. 5: 255-266.
5. United States Pharmacopoeia 31: <1116> Microbial evaluation of clean rooms
7. and other controlled environments 2008.
8. Wallhäuser KH. Praxis der Sterilisation Desinfektion - Konservierung. Georg Thime Verlag Stuttgart - New York 1995.
9. Istituto Superiore della Sanità per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro. Linee guida sugli standard di sicurezza e di igiene del lavoro nel reparto operatorio. ISPELS 2009