

Ricerche sul contenuto microbico di materie prime impiegate nelle preparazioni farmaceutiche

EDOARDO BONOMI e FRANCO NEGRETTI

Cattedra di Microbiologia e Igiene, Facoltà di Farmacia, Università di Milano

Riassunto. — I controlli microbiologici (determinazione della carica batterica totale e micetica; ricerca di enterococchi, *Clostridium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staph. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* e altre *Enterobacteriaceae*) compiuti su 1517 campioni di 100 materie prime diverse, appartenenti a diversi lotti di produzione e provenienti da diversi fornitori, hanno rilevato l'esistenza di una contaminazione microbica variabile secondo le materie, con presenza anche di microrganismi patogeni o igienicamente indesiderabili. Le sostanze più contaminate sono risultate quelle organiche, sia di origine vegetale che animale.

Sono state osservate differenze sensibili fra lotto e lotto e fra i diversi fornitori.

Le prove di conservazione in diverse condizioni di temperatura (15° - 22° - 37 °C) e di umidità (30° - 60° - 90° di umidità relativa) con contenitori chiusi o aperti, hanno dimostrato la possibilità di notevoli incrementi della carica microbica nelle materie prime con l'aumentare della temperatura e dell'umidità, specie con contenitori non chiusi ermeticamente.

Summary (*Research on the microbial contents of raw material used in pharmaceutical preparations*). — The microbiological controls (determination of the total and mycetic bacterial count; isolation of enterococci, *Clostridium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staph. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae*) executed on 1517 samples of 100 various raw materials, have ascertained the presence of a microbial contamination varying to matters, with presence also of pathogenic or hygienically undesirable microorganisms.

The more contaminated substances have resulted to be those organic either of vegetable or animal origin. Sensible differences have been noted between the various lots and according to the various suppliers.

The conservation trials under various conditions of temperature (15 - 22 - 37 °C) and humidity (30° - 60° - 90° of relative humidity) with opened

or closed recipients, have demonstrated the possibility of remarkable increases of the number of the microorganisms in the raw materials with increase of temperature and humidity, especially in the non hermetically closed recipients.

INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO

I farmaci non sottoposti all'obbligo della sterilità microbica sono da qualche tempo oggetto di particolare interesse da parte di studiosi e di tecnici. Diversi i motivi di questa sensibilizzazione: da un lato le segnalazioni ripetute di infezioni dovute alla somministrazione di farmaci; dall'altro la constatazione di fenomeni di degradazione, scomposizione, inattivazione di farmaci, operati dalla microflora di contaminazione.

Per quanto riguarda episodi infettivi provocati dall'uso di farmaci, nel 1942 Welch e coll. [1] hanno segnalato la presenza di spore del tetano in polvere sulfamidica. Nel 1949 Sevitt [2] ha descritto due casi di tetano da talco inquinato.

Nel 1965 Kallings e Ernerfeldt [3] hanno rilevato casi di salmonellosi in operatori di una officina farmaceutica svedese. Nel 1965 Dony [4] ha osservato casi di salmonellosi in bambini trattati con uno sciroppo inquinato. Kallings, Ringertz e Silverstolpe [5] nel 1966 hanno evidenziato una epidemia di salmonellosi (237 persone contagiate) in Svezia, causata da un preparato a base di tiroide inquinata.

Negli Stati Uniti nel 1966 l'U.S. Department of Health [6] ha segnalato casi di salmonellosi, precisamente da *Salmonella cubana*, in seguito all'uso di capsule contaminate. Episodi analoghi sono stati osservati da Lang e coll. [7] e Komarmy e coll. [8] nel caso di capsule colorate con rosso carminio.

Per quanto riguarda i preparati oftalmici, Crompton nel 1962 [9] ha segnalato in Australia casi di infezione dovuti a collirio contaminato. Kallings e Ernerfeldt [3] hanno a loro volta riferito su due episodi occorsi in Svezia di cecità dovuta a pomate oftalmiche inquinate da *Ps. aeruginosa*.

Segnalazioni di contaminazione si sono avute in Inghilterra nel 1965 da parte del British Medical Journal (anonimo) [10]: 15 casi di infezioni da *Ps. aeruginosa* in seguito all'impiego di una soluzione salina per uso oftalmico. Nel 1966 Kallings, Ernerfeldt e Silverstolpe [11] hanno riferito ancora su episodi di gravi infezioni oculari provocate da colliri contaminati con *Ps. aeruginosa*.

Ricordiamo inoltre che, secondo un'inchiesta della F.D.A., in passato negli Stati Uniti d'America ben il 12 % dei colliri in commercio è risultato contenere batteri responsabili di ulcere alla cornea.

Nel 1966 Phillips [12] ha illustrato quattro casi di infezione polmonare da *Ps. aeruginosa*, causati da pomate alla lidocaina contaminata, applicata

durante cateterizzazione tracheale. Mertz e coll. [13] hanno segnalato una infezione polmonare da *Kl. pneumoniae*, dovuta all'inalazione di aerosol contaminato.

Anche per quanto riguarda i preparati di impiego urologico esistono segnalazioni di infezioni: Mitchell e Hayward, ad esempio, nel 1966 hanno segnalato sette casi di infezioni da cloroexidina contaminata con *Ps. aeruginosa* [14].

La contaminazione microbica dei preparati farmaceutici può condurre, come già accennato, anche a fenomeni di degradazione e inattivazione del farmaco stesso, come riportano Meyer [15], French [16], Sykes [17], Dony [18].

A questo proposito, Penso [19], ricorda che molti microrganismi possono ridurre il potassio clorato a cloruro, decomporre alcaloidi e il piramidone, e, mediante la liberazione di numerosi enzimi, possono interferire sulla stabilità dei farmaci. Ad esempio, lo *Ps. aeruginosa* è in grado di decomporre l'atropina solfato, omatropina bromidrato, la procaina e la pentocaina. La produzione da parte di batteri (non necessariamente patogeni) di svariati enzimi può alterare le caratteristiche organolettiche del preparato farmaceutico con modificazioni dell'aspetto e del gusto.

In alcune Farmacopoe (Nordica, [20], Cecoslovacca [21] Statunitense [22], Inglese [23],) si riportano monografie specifiche sui limiti di contaminazione, e di materie prime e di prodotti farmaceutici finiti. Analogo lavoro è in corso per la Farmacopea Europea [24]. In tale contesto appare evidente l'importanza di poter disporre di materie prime, principi attivi ed eccipienti con il più basso indice di contaminazione.

Sull'inquinamento microbico dei principi attivi ed eccipienti sono comparsi in questi ultimi anni alcuni lavori, a cominciare dalla relazione presentata nel 1965 al Consiglio Nazionale della Sanità Svedese [25].

Gli esperti svedesi hanno sottoposto ad analisi microbiologica, secondo quanto risulta dal documento, 50 campioni di amido, così suddivisi in rapporto all'origine: n. 41 di patate, n. 6 di grano e n. 3 di mais.

I controlli hanno evidenziato la presenza numericamente massiccia di microrganismi in genere (fino a $2 \cdot 10^4/g$) e di coliformi in particolare, presenti in 38 campioni sui 41 di amido di patate. Migliore è risultata la qualità igienica dell'amido di mais (di cui però solo 3 campioni sono stati analizzati), che ha presentato carica batterica minima (< 10 germi/g) con assenza di colibacilli.

Intermedie sono risultate le caratteristiche dell'amido di grano.

Nel 1968 i danesi Pedersen e Ulrich [26] hanno pubblicato dati microbiologici su 226 lotti di 84 differenti materie prime.

La determinazione della carica batterica è stata eseguita sia su piastre (incubate a 32 - 34 °C), sia facendo ricorso al metodo delle diluizioni (impiegati due terreni, incubati a due diverse temperature, 37 °C e 20 - 25 °C).

Le indagini quantitative sono state completate da quelle qualitative, quali la ricerca di *E. coli* e *Salmonella* sp., compiute su 1 g di sostanza.

Tra le materie prime analizzate, alcune hanno presentato una carica batterica superiore a 10.000 germi/g e, precisamente, agar polvere, amido solubile, cacao, caolino, digitale (foglie) e glicirizza (radice). In un campione di digitale la carica ha superato 10^7 germi/g. *E. coli* è stato ritrovato in complessivi 9 lotti di 8 materie prime (amido di patate, gomma arabica, digitale foglie, glicirizza radice, lattosio, prednisone, prednisolone e talco). In un campione di glicirizza radice sono stati riscontrati 10^4 *E. coli*. La *Salmonella* non è stata mai isolata.

Nel 1969 Dony [18] alle « Journées Pharmaceutiques Internationales de Paris » ha comunicato referti batteriologici su 357 campioni di materie prime. Queste comprendevano: sostanze inorganiche (62 campioni), organiche ben definite (100 lotti) e prodotti di origine naturale non purificati (185 campioni). Le metodiche impiegate per il controllo non sono state menzionate.

Le materie prime inorganiche generalmente non hanno presentato carica batterica rilevante (< 100 germi/g); tuttavia alcuni campioni di carbonato di magnesio, idrossido di magnesio, caolino, silicato di magnesio e idrossido di alluminio hanno toccato livelli di 10^{3-4} germi/g.

Le sostanze organiche purificate e definite sono risultate, secondo le ricerche di Dony, nettamente migliori, mai superando la carica batterica il limite di 10^4 germi/g. Le sostanze « brute » di origine naturale si sono rivelate le più contaminate: il 25,5 % dei campioni ha superato, a volte anche largamente, i 10^4 germi/g, con frequente presenza di enterococchi ed enterobatteri.

L'anno successivo Henning [27] in un suo lavoro sui metodi di controllo dei medicinali non sterili ha ripreso la suddivisione di Dony, distinguendo:

1) Sostanze che presentano, nella maggior parte dei casi, forte contenuto microbico (da contaminazione sia primaria, che secondaria).

Tali sono le materie prime di origine animale, come estratti e polveri di organi vari (fegato, rene, tiroide, placenta, ecc.), nonché farine e gelatine animali, latte in polvere, caseina, lisati vari.

2) Sostanze che presentano normalmente un grado di contaminazione medio, ma a volte (specie per contaminazione secondaria) notevole.

Esse sono rappresentate da materie prime di origine vegetale, quali gomma arabica ed adragante, farine e amidi, agar-agar, cacao in polvere, ecc.

3) Sostanze che presentano un modesto grado di contaminazione, per lo più secondaria, quali le sostanze di origine minerale. Purtroppo nel lavoro di Henning non vengono forniti i valori di contaminazione riscontrata.

Nel 1971 Sykes [28] ha fatto una rassegna sintetica della bibliografia del momento, fornendo altresì alcuni dati di indagini personali, che in linea di massima confermano la letteratura precedente. In particolare ha rilevato

una notevole contaminazione di molte sostanze naturali (animali, vegetali, minerali); fenomeno non generalizzabile, tuttavia, in quanto alcune sostanze della stessa origine presentavano carica batterica molto bassa. L'A. ha rilevato ancora notevoli oscillazioni di qualità tra i vari fornitori.

Il 1972 è stata una annata particolarmente feconda di ricerche sull'argomento, essendo stati pubblicati lavori di Buhlmann e coll. [29], Gallien [30] e Penso [19].

Buhlmann e coll., hanno riportato, voce per voce, i risultati ottenuti su 71 materie prime di quattro tra le più importanti ditte farmaceutiche svizzere. Gli AA. hanno eseguito, oltre alla determinazione della carica batterica e micetica, la ricerca degli enterobatteri e di *Pseudomonas aeruginosa*. I metodi utilizzati sono stati quelli, già illustrati nel 1968, dagli stessi AA. [31, 32].

Nella maggior parte dei casi si sono rilevate contaminazioni di livello accettabile; comunque in alcune partite sono risultate pesantemente inquinate o contenevano germi indesiderati le seguenti materie prime: agar-agar, alginato di sodio, amido di frumento, amido di mais, amido di patate, cacao, cellulosa microcristallina, cioccolato in polvere, coloranti alimentari, farina di guar, farina di mais, gelatina, gomma adragante, gomma arabica, latte magro in polvere, magnesio trisilicato, noce moscata in polvere, pepsina, polvere di radice di giaggiolo, radice di galanga, siliconi emulsionanti e talco. Forti differenze sono state segnalate tra i lotti prodotti dai diversi fornitori.

Gallien nello stesso anno ha rilevato una stretta correlazione tra inquinamento delle materie prime e quello dei prodotti finiti. L'A. ha notato la presenza di germi igienicamente indesiderabili (enterobatteri) in alcune sostanze (acido silicico, amido di frumento e di riso, cacao, gelatina, gomma arabica, latte magro in polvere, lattosio, vitamina A, acetato, zeina). Gallien ha riconfermato l'esistenza di forti differenze tra le Ditte fornitrici.

Penso nella sua relazione presentata alla Commissione tecnica della « Farmacopea Europea » nel 1972 ha accettato la suddivisione delle materie prime nelle tre categorie (già di Dony), confermando che nelle sostanze organiche di origine naturale si rileva il maggior grado di contaminazione. Ha ritrovato infatti in 13 campioni su 51, una carica batterica superiore a $10^4/g$.

Le sue indagini su complessivi 120 campioni di materie prime hanno fornito risultati sostanzialmente concordanti con quelli di Dony.

Kruger nel 1973 [33] ha effettuato controlli su 114 materie prime diverse per complessivi 1032 lotti.

La ricerca di *E. coli* e *Ps. aeruginosa* è stata positiva in 8 delle 154 partite di pancreatina esaminate.

Prendendo come criterio il limite di 100 germi totali/g, il 14 % delle 114 materie prime non è risultato conforme.

Considerando come valore soglia 1.000 batteri/g, ha superato invece i limiti il 12,2 % delle materie prime.

Per quanto riguarda i miceti, con un limite di 100 miceti/g, il 14,9 % di sostanze non è stato conforme.

Se contemporaneamente si pongono quali limiti 1.000 batteri a 100 miceti per g, si osserva che il 19,2 % esce dai limiti.

Le sostanze più inquinate sono risultate quelle di origine naturale (animale, vegetale, minerale) ed i coloranti.

Nello stesso anno Speiser [34] ha affermato che le materie prime di origine naturale (quali amidi, bentonite, gomma adragante ed arabica, talco) possono essere pesantemente contaminate all'origine; mentre per quelle sintetiche vi può essere pericolo di contaminazione secondaria.

Nel 1974 Kruger [35] è ritornato sull'argomento, rilevando su 181 materie prime analizzate una percentuale del 17 % di sostanze non conformi per la entità della carica batterica; ben il 14 % di queste erano sostanze di origine biologica.

Wildmann e Croome [36] in una pubblicazione del 1975 hanno fornito dati relativi all'isolamento di enterobatteri in alcune materie prime e, precisamente, gelatina, gomma arabica, cacao, acido silicico, latte magro in polvere, magnesio stearato, lattosio, amido di riso e di mais, vitamina A acetato e zeina. Il più comune inquinante fra gli enterobatteri è risultato l'*Enterobacter cloacae*.

Nello stesso anno Gay [37] in una pubblicazione inerente alla purezza microbiologica delle specialità farmaceutiche ha riportato tra le materie prime passibili di forte contaminazione (oltre a amidi, cacao polvere, estratti animali di tiroide, pancreas e fegato, droghe, gelatina, gomma arabica) anche sostanze come calcio fosfato, calcio lattato, caolino, carbone adsorbente, idrossido di alluminio, lattoalbumina, magnesio (carbonato, solfato e trisilicato) e anche coloranti (sia sintetici che naturali).

Noi pure nel 1975 [38] abbiamo compiuto un'indagine preliminare sulle caratteristiche igieniche delle principali materie prime ed eccipienti impiegati in Italia per la preparazione dei prodotti medicinali solidi. I campioni analizzati sono stati 520, appartenenti a 55 diverse sostanze.

È emerso dai controlli che le sostanze inorganiche di origine minerale sono generalmente poco inquinate. Infatti l'84,6 % di esse ha presentato una carica inferiore a 100 germi/g e nessun campione ha superato il valore soglia di 10^4 germi/g.

Per le sostanze organiche di sintesi o comunque molto purificate, la situazione è risultata più complessa: il 61 % è risultato contenere meno di 100 germi/g, mentre il 31,7 % ha superato i 1000 germi/g e il 7,9 % oltrepassato i 10^4 germi/g.

Igienicamente si sono rivelate scadenti le sostanze di origine animale, dove solo il 42,4 % dei campioni è stato al disotto dei 100 germi/g, mentre il 7,4 % ha superato il 10^4 e l'1,9 % anche i 10^5 germi/g.

La presenza di germi indesiderati in questo ultimo gruppo di sostanze è stata evidenziata nel 8,6 % dei casi con l'isolamento di due ceppi di *Salmonella*. Forti variazioni sono state riscontrate in diversi campioni della stessa materia prima.

Nel 1976, Zuge [39] ha evidenziato nel 20 % delle materie prime esaminate cariche batteriche superiori ai 1.000 germi/g, mentre germi indesiderati sono risultati presenti nel 1,35 % dei casi.

Ancora nel 1976 Hein e Miklovich [40] hanno esaminato 74 diverse materie prime per complessivi 891 lotti. Anche i dati di questi AA. confermano l'esistenza in materie prime di origine animale e vegetale (fra cui tuorli d'uovo in polvere, pancreatina, cellulasi, gomma arabica, cacao polvere, estratto di malto) di un cospicuo inquinamento batterico.

Tuttavia, pure alcune sostanze sintetiche (sulfamidici, coloranti) hanno presentato massicce contaminazioni.

Al termine di questa rassegna bibliografica, si può, pertanto, concludere che il pericolo di contaminazione microbica nelle materie prime per uso farmaceutico è sensibilmente frequente e può assumere, talora, aspetti di indubbia gravità.

Ciò nonostante, salvo la segnalazione di Penso del 1972 e la nostra, preliminare, del 1975, non sono state ancora compiute in Italia indagini estese su tale problema. Eppure la ricerca potrebbe essere interessante, in quanto esistono differenze produttive notevoli fra paese e paese.

Sia per questi motivi, sia anche per portare ulteriori contributi ai dati, certamente non esaurienti, della letteratura, noi abbiamo ritenuto opportuno eseguire un esame batteriologico approfondito di un consistente numero di materie prime reperibili sul mercato italiano, prendendo in considerazione non solo i principi attivi, ma anche gli eccipienti, che notoriamente predominano dal punto di vista ponderale nella formulazione dei preparati farmaceutici.

PIANO DELLE RICERCHE

Esso è stato così articolato:

1) In una prima serie di prove sono stati sottoposti a controllo microbiologico n. 1517 campioni di materie prime, provenienti da diversi fornitori e appartenenti a diversi lotti produttivi. I campioni appartenevano a 100 sostanze diverse (inorganiche, di origine minerale, organiche sintetiche, organiche naturali, sia di origine animale che vegetale).

Le ricerche sono state soprattutto estese a carico delle materie prime, che per l'origine o per i peculiari processi produttivi sono più esposte al rischio dell'inquinamento batterico.

In particolare, sono state oggetto di speciale attenzione le seguenti sostanze: acido citrico, acido silicico compositum, agar-agar, aloe, altea, amido di mais, amido di patate, amido di riso, anice, aromi in polvere (arancio, lampone e limone), belladonna (foglie), bile bovina, boldo (foglie), cacao amaro polvere, caolino, cascara sagrada (corteccia), china (corteccia), cuore (polvere), digitale (foglie), eparina sodica, frangola (corteccia), farina di semi di carrube, gelatine (vari tipi), genziana (radice), giallo tartrazina, glucosio, gomma (arabica e lacca), hamamelis (foglie), ipofisi (polvere), lanolina, latte in polvere, lattosio, liquerizia (radice), mannite, menta (foglie), ovaia (polvere), poligala (radice), ponceau 4 R, rabarbaro (rizoma), rene (polvere), senna (foglie), stramonio (foglie), talco, testicolo (polvere), timo, trombo-plastina, valeriana (radice), zucchero (saccarosio).

Su tutti i campioni sono state compiute le seguenti determinazioni microbiologiche:

- a) determinazione della carica batterica (aerobi mesofili);
- b) determinazione della carica micetica;
- c) ricerca di microrganismi patogeni o indesiderati dal punto di vista igienico, quali *E. coli*, *Salmonella* e altre *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, streptococchi fecali e clostridi solfito-riduttori.

2) In una seconda serie di prove abbiamo voluto stabilire quali possono essere le variazioni di qualità igienica di materie prime provenienti da diversi produttori.

Allo scopo abbiamo preso in considerazione 15 lotti di cacao amaro polvere, provenienti da tre diversi produttori (A, B, C) e 60 lotti di gelatina granulare, pure originanti da tre produttori diversi (D, E, F).

In tutti i campioni di queste sostanze, di largo impiego farmaceutico, sono state compiute la conta batterica e la ricerca di microrganismi patogeni o indesiderati sotto il profilo igienico.

3) Infine si è voluto studiare l'influenza delle condizioni di conservazione (temperatura, umidità, contenitori) sulla carica microbica di alcune materie prime.

Le indagini sono state limitate a due fra i più comuni e diffusi eccipienti sospetti di contaminazione e, precisamente, l'amido di mais e lo zucchero.

All'uopo 10 partite di amido di mais e di zucchero (saccarosio), dopo essere state sottoposte alla determinazione della carica batterica, sono state conservate a tre diverse temperature (15 - 22 - 37 °C) e con umidità

relativa al 60 % per 30 giorni, in contenitori originali sia tenuti chiusi, che aperti.

Al termine del periodo fissato si è proceduto ad una nuova determinazione della carica batterica.

Un'ulteriore serie di prove è stata effettuata sulle materie prime conservate alla temperatura di 22 °C in diverse condizioni di umidità relativa (30-60-90 %).

Anche in questo caso il periodo di conservazione è stato di 30 giorni, al termine del quale è stata ripetuta la conta microbica.

Le variazioni rilevate della carica microbica sono state espresse come valori percentuali rispetto alla carica iniziale, fatta uguale 100.

MATERIALI E METODI

a) *Campioni di materie prime.*

I campioni esaminati sono stati prelevati dai diversi lotti di produzione secondo le norme U.S. Military Standard 105-D [41] « General Inspection Level » II e, precisamente, in numero di due campioni nel caso di 2-8 contenitori, di tre campioni in caso di 9-15 contenitori, di cinque campioni per 16-25 contenitori, di otto campioni per 26-50 contenitori, ecc.

Il prelievo delle materie prime è stato effettuato secondo rigorose norme asettiche e nella quantità di 10 g per la determinazione della carica batterica e micetica e di 1 g per ogni singola ricerca di microrganismi patogeni o igienicamente indesiderati.

b) *Preparazione del campione.*

Essa è stata realizzata tenendo presenti le caratteristiche delle materie prime in esame, secondo le metodiche proposte dalla « Fédération Internationale Pharmaceutique » [42, 43].

Le materie prime idrosolubili sono state diluite in rapporto 1 : 10 in soluzione tamponata sterile a pH 7 (fosfato monopotassico: 3,56 g; fosfato bisodico · 2H₂O : 7,23 g; cloruro di sodio: 4,30 g; peptone: 1,0 g; acqua distillata: q.b. a 1000).

I prodotti non idrosolubili di natura grassa sono stati dapprima addizionati di identica quantità in peso di polisorbato 20 o 80 a 40 °C e, successivamente, di soluzione tamponata sterile a pH 7 in quantità otto volte superiore, scaldata a 40 °C, agitando in modo da ottenere una emulsione omogenea.

Le materie prime di natura non grassa e non idrosolubile sono state, invece, diluite 1 : 10 con soluzione tampone pH 7, ricorrendo alla omoge-

neizzazione meccanica o, in caso di difficile sospensibilità, alla aggiunta del 0,1 % di polisorbato 20 o 80.

In ogni caso, naturalmente, ci si è preoccupati di portare il pH a valori vicini alla neutralità.

c) *Determinazione della carica batterica totale.*

I campioni così allestiti alla diluizione 1 : 10, sono stati successivamente sottoposti a diluizione progressiva in soluzione tamponata sterile pH 7 e inclusi direttamente in piastre di terreno agarizzato, nel caso di prodotti non facilmente filtrabili, oppure filtrati su membrana con porosità 0,22 μ , deponendo poi questa sulla superficie di piastre di terreno solido.

Il terreno culturale solido impiegato è stato il Soybean-Casein-Digest-Agar-Medium.

L'incubazione è stata protratta per 5 giorni alla temperatura di 32-35 °C.

d) *Determinazione della carica micetica.*

I campioni diluiti secondo le modalità sopra menzionate sono stati inclusi direttamente in piastre di Sabouraud-Dextrose-Agar addizionate di cloramfenicolo nella quantità di 50 mg/litro, o filtrati su membrana 0,22 μ , deponendo successivamente questa sulla superficie di piastre contenenti il medesimo terreno.

L'incubazione è stata effettuata in questo caso alla temperatura di 22-25 °C per la durata di 5 giorni.

e) *Ricerca delle Enterobacteriaceae.*

Il campione, preparato secondo le tecniche illustrate precedentemente, è stato dapprima inoculato nella quantità di 10 ml (equivalente a 1 g) in 100 ml di terreno di arricchimento di Mossel e coll. [44], incubando poi per 24 h alla temperatura di 35-37 °C.

Quindi, si è proceduto all'isolamento in piastre di Violet-Red-Bile-Agar addizionato di glucosio 1 %.

Dopo incubazione per 24 h a 35-37 °C, si è proceduto alla lettura dei risultati, sottoponendo in seguito le colonie sospette a ulteriori prove di identificazione secondo le normali tecniche microbiologiche.

f) *Ricerca di Pseudomonas aeruginosa.*

Una quantità del campione equivalente a 1 g è stata seminata in 100 ml di Fluid-Soybean-Casein-Digest-Medium, incubando per 48 h a 35-37 °C.

Al termine dell'incubazione si è effettuato l'isolamento su piastre di Cetrimide-Agar-Medium, che sono state incubate per 48 h alla stessa temperatura.

Sulle colonie sospette sono state eseguite ulteriori indagini di conferma.

g) *Ricerca di Staphylococcus aureus.*

Dopo semina ed incubazione del campione preparato in Fluid-Soybean-Casein-Digest-Medium, secondo le modalità indicate nel precedente paragrafo, si è effettuato l'isolamento su piastre di Vogel-Johnson-Agar-Medium, incubando per 48 h a 35-37 °C.

Le colonie sospette sono state sottoposte ad esami batteriologici per la valutazione della patogenicità (coagulasi, emolisi, fermentazione della manite, ecc.).

h) *Ricerca degli streptococchi fecali.*

Il campione preparato è stato inoculato in quantità corrispondente a 1 g in 100 ml di Streptosel-Broth, incubando per 48 h a 35-37 °C [45].

Il successivo isolamento è stato realizzato sia su Streptosel-Agar, sia su Bile-Esculine-Agar, incubati a 45 °C per 24 h.

Sulle colonie sospette sono state compiute ulteriori ricerche di identificazione.

i) *Ricerca dei clostridi solfito-riduttori.*

Un grammo del campione preparato è stato seminato in 100 ml di Tryptose-Sulfite-Cicloserine-Broth secondo Mossel e Pouw [46], incubando anaerobicamente con sistema tipo Gas-Pack a 35-37 °C per 48 h.

Si è proceduto, quindi, alla semina in piastre di Petri su strato di Tryptose-Sulfite-Cicloserine-Agar, subito ricoperto da un altro strato di identico terreno colturale [47].

Al termine dell'incubazione (compiuta anaerobicamente a 35-37 °C per 24 h) si è proceduto all'esame delle colonie.

RISULTATI

I risultati ottenuti dall'insieme delle indagini si possono così riassumere:

1) Gli esami batteriologici compiuti su 100 diverse materie prime, per un totale di 1517 campioni esaminati, hanno evidenziato notevoli differenze nel grado e tipo di contaminazione batterica.

Infatti accanto a sostanze presentanti una minima carica inquinante, quali ad esempio bicarbonato di sodio, biossido di titanio, carbowaxs, essenze vegetali, vaselina bianca, se ne ritrovano altre pesantemente contaminate, quali agar-agar, aloe, amidi, belladonna, boldo, cacao, cascara sagrada, cuore, digitale, gelatina, gomma, ipofisi, menta, ovaia, rabarbaro.

2) Scendendo all'analisi dei reperti relativi alla carica batterica totale (Tab. 1 e Fig. 1), il 15,3 % (232 lotti) dei campioni ha presentato valori inferiori a 10 per grammo, il 20,1 % (305 lotti) carica fra 10 e 100, il 27,7 % (420 lotti) carica fra 100 e 1.000, il 22,5 % (342 lotti) carica fra 1.000 e 10.000, il 9,6 % (145 lotti) carica fra 10.000 e 100.000, e il 4,8 % (73 lotti) carica superiore a 100.000 per grammo.

3) Le determinazioni della carica micetica (Fig. 1 e Tab. 1) hanno, a loro volta, messo in evidenza che il 50,7 % dei campioni (769 lotti) possiede una carica inferiore a 10 per grammo, il 23,1 % (351 lotti) carica tra 10 e 100, il 15,7 % (238 lotti) carica tra 100 e 1.000, l'8,5 % (129 lotti) carica tra 1.000 e 10.000, l'1,9 % (29 lotti) carica tra 10.000 e 100.000 e lo 0,1 % (1 lotto) carica micetica più elevata.

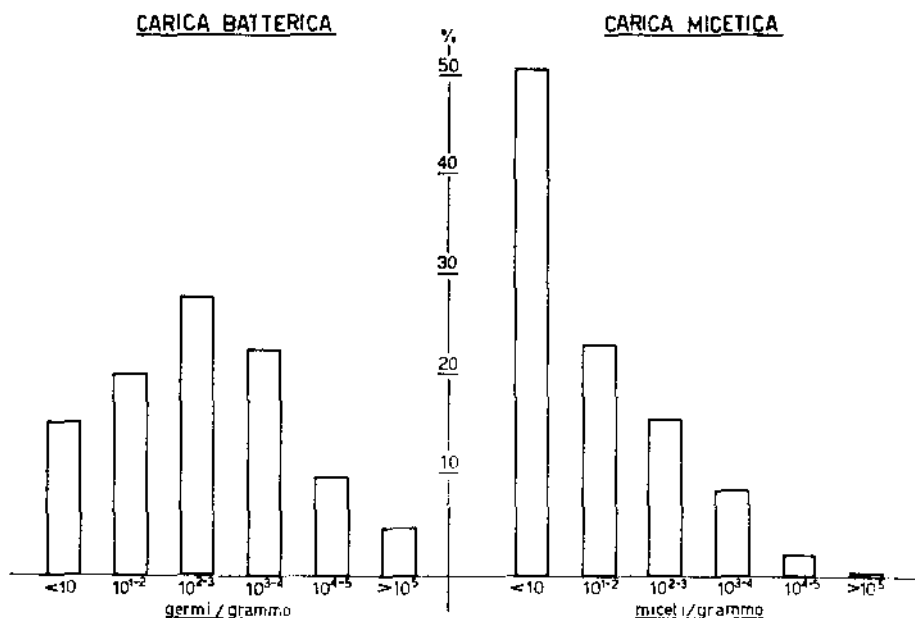


Fig. 1. — Distribuzione percentuale della carica batterica e micetica nelle materie prime.

TABELLA 1

Carica batterica e micetica delle materie prime

Tipo prodotto	N. Campioni	Carica batterica/g					Carica micetica/g						
		<10	10 ¹⁻²	10 ²⁻³	10 ³⁻⁴	10 ⁴⁻⁵	>10 ⁵	<10	10 ¹⁻²	10 ²⁻³	10 ³⁻⁴	10 ⁴⁻⁵	>10 ⁵
Acetato-ftalato di cellulosa F.U. . . .	3	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acido citrico F.U.	10	4	4	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acido silicico (vari tipi)	7	4	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acido silicico compositum	15	10	1	1	3	—	—	—	—	—	—	—	—
Acido tartarico F.U.	3	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Agar-agar F.U.	40	—	1	5	20	6	1	10	29	—	—	—	—
Alcool cetilico	2	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Alcol F.U.	10	1	1	4	1	2	1	—	—	—	—	—	—
Altea F.U.	15	—	7	5	2	1	—	—	—	—	—	—	—
Amido di mais F.U.	22	—	—	3	15	4	—	—	—	—	—	—	—
Amido di patate F.U.	30	—	13	8	6	2	1	14	13	1	1	1	—
Amido di riso F.U.	10	—	—	3	5	1	1	7	—	1	1	1	—
Anice (frutto) F.U.	16	1	1	10	4	—	—	2	1	7	3	2	1
Aroma arancio polvere	10	3	4	2	1	—	—	8	2	—	—	—	—
Aroma lampone polvere	13	4	6	1	2	—	—	4	7	2	—	—	—
Aroma limone polvere	11	—	4	4	3	—	—	4	4	3	—	—	—
Balsamo Tolu	2	2	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
Belladonna (foglie) F.U.	14	—	—	10	1	1	2	—	10	1	1	2	—
Bicarbonato di sodio F.U.	11	11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bile bovina	16	—	5	11	—	—	—	1	11	4	—	—	—

Segue: TABELLA I

Carica batterica e micetica delle materie prime

Tipo prodotto	N. Campioni	Carica batterica/g					Carica micetica/g						
		< 10	10 ¹⁻²	10 ²⁻³	10 ³⁻⁴	10 ⁴⁻⁵	> 10 ⁵	< 10	10 ¹⁻²	10 ²⁻³	10 ³⁻⁴	10 ⁴⁻⁵	> 10 ⁵
Biossido di titanio F.U.	2	2	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
Boldo (foglie) F.U.	18	—	—	3	6	5	4	—	4	2	9	3	—
Burro cacao	3	3	—	—	—	—	—	2	1	—	—	—	—
Cacao amaro polvere	22	—	—	7	6	4	5	8	5	6	2	1	—
Calcio carbonato F.U.	10	5	5	—	—	—	—	7	3	—	—	—	—
Caolino F.U.	11	—	4	3	4	—	—	4	4	2	1	—	—
Cannella olio essenziale	1	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Caramello cristallino	4	—	4	—	—	—	—	2	2	—	—	—	—
Carbowax 400	2	2	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
Carbowax 4000	2	2	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
Carbowax 6000	2	1	1	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
Cascara S. (corteccia)	20	1	—	4	7	5	3	—	3	10	4	3	—
Cellulosa microcristallina F.U.	3	—	3	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—
Cera carnauba	3	—	3	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—
Cera d'api	1	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
China (corteccia) F.U.	10	—	4	3	3	—	—	—	4	3	3	—	—
Ciliegia (essenza)	2	2	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
Gremophor	2	2	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
Clorofilla (polvere)	5	—	5	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—
Cuore (polvere)	22	—	1	14	2	3	2	—	7	8	6	1	—

Segue: TABELLA I

Carica batterica e micetica delle materie prime

Tipo prodotto	N° campioni	Carica batterica/g					Carica micetica/g						
		<10	10 ¹⁻²	10 ²⁻³	10 ³⁻⁴	10 ⁴⁻⁵	>10 ⁵	<10	10 ¹⁻²	10 ²⁻³	10 ³⁻⁴	10 ⁴⁻⁵	>10 ⁵
Digitale (foglie) F.U.	18	—	—	10	2	3	3	—	12	2	2	2	—
Eparina sodica F.U.	12	9	3	—	—	—	—	12	—	—	—	—	—
Estratto balsamico espettorante	1	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Eucaliptolo (estratto)	2	2	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
Farina semi carrube	15	—	7	4	4	—	—	7	5	2	1	—	—
Frangola (corteccia) F.U.	13	—	5	2	3	3	—	7	2	3	1	—	—
Garofano (essenza) F.U.	1	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Gelatina capsule	257	34	94	113	16	—	—	244	10	3	—	—	—
Gelatina granulata (vari tipi) F.U.	100	3	25	13	22	20	17	70	20	10	—	—	—
Gelatina polvere F.U.	12	—	2	4	3	2	1	4	5	3	—	—	—
Genziana (radice) F.U.	15	—	—	10	2	2	1	5	8	1	1	—	—
Giallo tartrazina E 102	14	—	1	10	2	1	—	7	7	—	—	—	—
Glicerina bidistillata F.U.	2	—	2	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
Glucosio F.U.	14	3	3	3	4	1	—	3	10	1	—	—	—
Gomma arabica (vari tipi) F.U.	62	—	—	11	46	1	4	32	14	15	1	—	—
Gomma lacca F.U.	13	—	2	1	10	—	—	7	4	2	—	—	—
Hamamelis (foglie) F.U.	10	—	1	7	2	—	—	1	1	5	3	—	—
Iposifi (polvere) F.U.	13	—	—	3	3	4	3	3	3	3	2	2	—
Lanolina (anidra) F.U.	10	—	7	1	2	—	—	2	7	1	—	—	—
Latte in polvere (vari tipi)	47	—	1	6	26	14	—	41	4	2	—	—	—

Segue: TABELLA I

Carica batterica e micetica delle materie prime

Tipo prodotto	N Campioni	Carica batterica/g					Carica micetica/g						
		<10	10 ¹⁻²	10 ²⁻³	10 ³⁻⁴	10 ⁴⁻⁵	>10 ⁵	<10	10 ¹⁻²	10 ²⁻³	10 ³⁻⁴	10 ⁴⁻⁵	>10 ⁵
Lattosio F.U. (vari tipi)	17	5	2	—	9	1	—	10	7	—	—	—	—
Lavanda (olio essenziale)	1	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Liquerizia (radice) F.U.	10	—	4	2	2	1	1	—	4	4	1	1	—
Magnesio F.U. stearato	5	1	2	1	1	—	—	3	2	—	—	—	—
Mandarino (essenza)	2	2	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
Mannite F.U.	10	—	—	—	3	5	2	9	1	—	—	—	—
Massa neutralis	4	3	1	—	—	—	—	2	2	—	—	—	—
Menta (foglie) F.U.	33	—	3	10	10	7	3	3	3	18	5	4	—
Menta (olio F.U. essenziale)	2	2	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
Mentolo crist. F.U.	2	2	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
Olio di arachidi F.U.	3	—	—	3	—	—	—	3	—	—	—	—	—
Ossido di magnesio F.U.	2	2	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
Ovaia (polvere)	10	—	—	2	3	3	2	4	2	2	1	1	—
Pino Mugò estr. F.U.	1	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Poligala (radice) F.U.	12	—	—	2	3	7	—	—	7	4	1	—	—
Poncean 4 R E 124	10	—	—	6	3	1	—	1	9	—	—	—	—
Quercetina	5	5	—	—	—	—	—	4	1	—	—	—	—
Rabarbaro (estratto) F.U.	3	2	1	—	—	—	—	—	3	—	—	—	—
Rabarbaro (rizoma)	15	—	1	2	4	2	6	—	7	4	3	1	—
Rene (polvere)	15	—	1	5	5	2	2	4	4	4	2	1	—

Segue: TABELLA I

Carica batterica e micetica delle materie prime

Tipo prodotto	N° Campioni	Carica batterica/g					Carica micetica/g				
		< 10	10 ¹⁻²	10 ²⁻³	10 ³⁻⁴	10 ⁴⁻⁵	< 10	10 ¹⁻²	10 ²⁻³	10 ³⁻⁴	10 ⁴⁻⁵
		< 10 ⁵	10 ⁵⁻⁶	10 ⁶⁻⁷	10 ⁷⁻⁸	> 10 ⁸	< 10	10 ¹⁻²	10 ²⁻³	10 ³⁻⁴	> 10 ⁴
Senza (foglie) F.U.	10	—	1	4	4	—	—	4	3	2	—
Spermaceti F.U.	3	3	—	—	—	—	3	—	—	—	—
Stramonio F.U. (foglie)	10	—	1	3	3	—	1	6	—	3	—
Talco F.U.	107	5	10	48	36	—	7	18	26	56	—
Testicolo (polvere)	10	—	—	4	3	1	3	3	4	—	—
Timo F.U.	10	—	1	3	2	—	2	2	2	4	—
Tiroide F.U. (polvere)	12	—	—	4	4	1	2	4	4	1	1
Tromboplastina (polvere)	18	—	3	3	5	—	3	4	7	4	—
Tylose	2	—	2	—	—	—	2	—	—	—	—
Valeriana F.U. (rizoma-radici)	11	1	—	7	1	1	1	3	4	2	1
Vaselina bianca F.U.	1	2	—	—	—	—	2	—	—	—	—
Vit. A (vari tipi) F.U.	3	1	1	1	—	—	3	—	—	—	—
Vit. B ₁ F.U.	2	2	—	—	—	—	2	—	—	—	—
Vit. B ₂ F.U.	3	1	1	1	—	—	3	—	—	—	—
Vit. B ₆ F.U.	2	1	1	—	—	—	2	—	—	—	—
Vit. B ₁₂ F.U.	2	—	1	1	—	—	2	—	—	—	—
Vit. C F.U.	3	2	1	—	—	—	2	1	—	—	—
Vit. D ₂ F.U.	2	—	—	2	—	—	1	1	—	—	—
Vit. E F.U.	2	1	—	1	—	—	2	—	—	—	—
Zucchero (saccarosio vari tipi) F.U.	105	69	30	3	3	—	84	21	—	—	—

4) Gli esami batteriologici qualitativi indirizzati alla ricerca di microrganismi patogeni o indesiderati dal punto di vista igienico (Fig. 2 e Tab. 2) hanno portato all'isolamento di clostridi solfito-riduttori nello 0,85% (13 lotti) dei campioni analizzati, di *Pseudomonas aeruginosa* nel 1,98% (30 lotti), di *Staphylococcus aureus* nell'1,78% (27 lotti), di streptococchi fecali nel 2,2% (32 lotti), di *Escherichia coli* nel 5,8% (88 lotti), di *Salmonella* nello 0,33% (5 lotti); per quanto riguarda gli altri enterobatteri reperiti, questi sono risultati appartenere, in ordine di frequenza, ai generi *Enterobacter* (23 lotti), *Proteus* (23 lotti), *Citrobacter* (11 lotti), *Klebsiella* (2 lotti), e, un lotto ciascuno, *Erwinia*, *Providencia* e *Yersinia*.

5) Valutando globalmente i risultati ottenuti, ecco come sono risultate le diverse materie prime, distinte in tre categorie secondo le indicazioni di Gallien [30], Kruger [33] ed Hein e Miklovich [40].

In una prima categoria (Tab. 3), caratterizzata da carica batterica totale fino a 1.000 germi/g, da carica micetica fino a 100 elementi/g e da completa assenza di microrganismi patogeni e igienicamente significativi/g, possono essere incluse 46 materie prime.

In una seconda categoria (Tab. 4), raggruppante prodotti che hanno presentato almeno una volta valori di carica batterica compresa tra 10^3

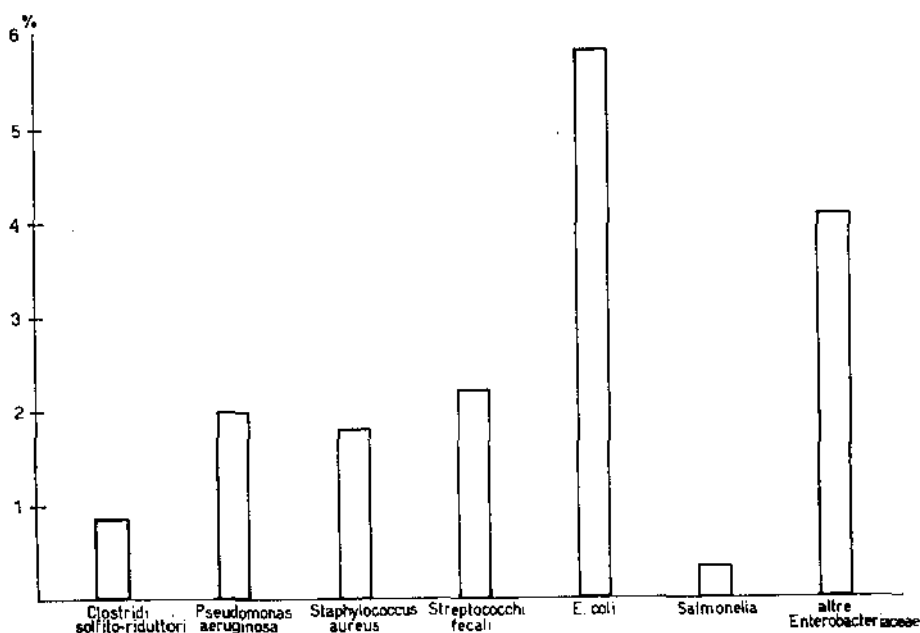


Fig. 2. — Percentuale della presenza di germi patogeni o indesiderati nelle materie prime.

TABELLA 2

Presenza di microrganismi patogeni o indesiderati nelle materie prime

MATERIA PRIMA	N. Campioni	Clostridi Sulfo-riduci.	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus	Streptococchi frecci	Enterobacteriaceae		
						E. coli	Salmon. nella	Altre
Acido silico composto	15	—	1	—	—	—	—	—
Agar-Agar	40	1	2	—	3	3	—	Citrobacter (1), Proteus (2)
Aloe	10	—	1	—	1	2	—	—
Amido di mais	22	—	1	—	1	4	—	Proteus (2)
Amido di patate	30	—	7	—	2	10	—	Proteus (4)
Amido di riso	10	—	—	—	—	2	—	Citrobacter (1), Proteus (1)
Belladonna (foglie)	14	—	1	—	—	3	—	—
Bile bovina (polvere)	16	—	—	—	2	2	1	—
Boldo (foglie)	18	—	1	2	—	1	—	—
Cacao amaro polvere	22	—	—	1	3	6	—	Citrobacter (2), Enterobacter (1), Erwinia (1), Proteus (2)
Caolino	11	1	—	—	—	1	—	—
Cascara S. (corteccia)	20	—	2	—	2	1	—	Citrobacter (2), Klebsiella (2)
Cuore (polvere)	22	—	—	1	1	—	1	—
Farina di semi di carruba	15	—	—	—	—	1	—	Citrobacter (1)
Gelatina capsule	230	—	—	—	—	2	—	—
Gelatina granulata	100	2	1	1	4	19	1	—
Glucosio	14	—	—	—	—	1	—	Citrobacter (1), Proteus (1)

Segue: TABELLA 2

Presenza di microrganismi patogeni o indesiderati nelle materie prime

MATERIA PRIMA	N. Campioni	Clostridi Solfiro-ridutr.	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus	Streptococchi feront	Enterobacteriaceae		
						E. coli	Salmonella	Altre
Gomma arabica	62	1	2	1	2	7	2	Citrobacter (2), Proteus (5), Providencia (1), Yersinia (1)
Gomma lacca	13	—	1	1	—	2	—	—
Iprofisi (polvere)	13	2	1	3	1	2	—	—
Latte in polvere	46	—	—	—	—	3	—	—
Lattosio	17	—	—	—	—	1	—	—
Liquerizia (radice)	10	—	—	—	1	2	—	—
Mannite	10	—	—	—	—	—	—	—
Menta (foglie)	30	—	3	2	—	—	—	Klebsiella (1)
Ovaia (polvere)	10	2	1	4	1	2	—	Citrobacter (1)
Rabarbaro rizoma	15	—	—	—	1	1	—	Proteus (4)
Rene (polvere)	15	—	—	1	2	2	—	—
Senna (foglie)	10	—	1	—	—	1	—	—
Talco	107	4	1	2	—	2	—	—
Testicolo (polvere)	10	—	1	3	1	1	—	—
Tiroide (polvere)	12	—	—	2	1	—	—	—
Tromboplastina (polvere)	18	—	1	3	—	—	—	—
Valeriana (rizoma-radice)	11	—	1	—	1	4	—	Proteus (2)

TABELLA 3

Materie prime con carica batterica $\leq 10^3$ germi/g; micetica $\leq 10^2$ germi/g ed assenza di germi patogeni o indesiderati su 1 g

- | | | |
|---------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| 1) Acetato ftalato di cellulosa | 16) Cera carnauba | 31) Olio di arachidi |
| 2) Acido silicico (vari tipi) | 17) Cera d'api | 32) Ossido di magnesio |
| 3) Acido tartarico | 18) Ciliegia (essenza) | 33) Pino mugo (estratto) |
| 4) Alcool cetilico | 19) Cremophor | 34) Quercetina |
| 5) Balsamo tolu | 20) Clorofilla (polvere) | 35) Rabarbaro (estratto) |
| 6) Bicarbonato di sodio | 21) Eparina sodica | 36) Spermaceti |
| 7) Biossido di titanio | 22) Estratto balsamico expectorante | 37) Tylose |
| 8) Burro cacao | 23) Eucaliptolo (estratto) | 38) Vaselina |
| 9) Calcio carbonato | 24) Garofano (essenza) | 39) Vitamina A (vari tipi) |
| 10) Cannella (olio essenziale) | 25) Glicerina bidistillata | 40) Vitamina B ₁ |
| 11) Caramello cristallino | 26) Lavanda (olio essenziale) | 41) Vitamina B ₂ |
| 12) Carbowax 400 | 27) Mandarino (essenza) | 42) Vitamina B ₆ |
| 13) Carbowax 4000 | 28) Massa neutralis | 43) Vitamina B ₁₂ |
| 14) Carbowax 6000 | 29) Menta (olio essenziale) | 44) Vitamina C |
| 15) Cellulosa microcristallina | 30) Mentolo cristalli | 45) Vitamina D ₂ |
| | | 46) Vitamina E |

TABELLA 4

Materie prime, prive di germi patogeni o indesiderati, che hanno evidenziato almeno una volta valori di carica batterica compresi tra 10^{3-4} germi/g e micetica tra 10^{2-3} germi/g

- | | |
|--------------------------|-------------------------|
| 1) Acido citrico | 4) Aroma limone polvere |
| 2) Aroma arancio polvere | 5) Lanolina |
| 3) Aroma lampone polvere | 6) Magnesio stearato |
| 7) Zucchero (saccarosio) | |

e 10^4 microrganismi/g e carica micetica fino a 10^3 elementi/g, ma comunque mai presenza di germi patogeni o igienicamente indesiderati, possono essere collocate 7 sostanze.

Alla terza categoria (Tab. 5), comprendente sostanze inquinate almeno una volta da specie microbiche patogene e indesiderate o massivamente contaminate (carica batterica totale superiore a 10^4 germi/g e carica micetica superiore a 10^3 /g) possono essere collocati 47 tipi di prodotti.

6) Considerando le materie prime esaminate dal punto di vista dell'origine (sostanze inorganiche o di origine minerale, sostanze organiche definite, sintetiche o molto purificate, sostanze organiche di origine animale e vegetale) si può osservare, pur con varie eccezioni, che nella prima categoria rientrano soprattutto sostanze organiche definite e inorganiche.

TABELLA 5

Materie prime che hanno evidenziato almeno una volta valori di carica batterica superiori a 10^4 germi/g, micetica superiore a 10^3 /g e presenza di germi patogeni o indesiderati/g

1) Acido silicico compositum	16) Cuore (polvere)	31) Lattosio (vari tipi)
2) Agar Agar	17) Digitale (foglie)	32) Liquerizia (radice)
3) Aloe	18) Farina semi carrube	33) Mannite
4) Altea	19) Frangola (corteccia)	34) Menta (foglie)
5) Amido mais	20) Gelatina capsule	35) Ovaia (polvere)
6) Amido di patate	21) Gelatina granulare (vari tipi)	36) Poligola (radice)
7) Amido di riso	22) Gelatina polvere	37) Ponceau 4 R E 124
8) Anice (frutto)	23) Glucosio	38) Rabarbaro (rizoma)
9) Bile bovina (polvere)	24) Genziana (radice)	39) Rene (polvere)
10) Belladonna (foglie)	25) Giallo tartrazina E 102	40) Senna (foglie)
11) Boldo (foglie)	26) Gomma arabica (vari tipi)	41) Stramonio (foglie)
12) Cacao amaro polvere	27) Gomma lacca	42) Talco
13) Caofino	28) Hamamelis	43) Testicolo (polvere)
14) Cascara S. (corteccia)	29) Ipofisi (polvere)	44) Timo
15) China (corteccia)	30) Latte in polvere (vari tipi)	45) Tiroide (polvere)
		46) Tromboplastina (polvere)
		47) Valeriana (rizoma-radice)

La seconda comprende un gruppo di materie prime eterogenee (acido citrico, aromi in polvere, lanolina, magnesio stearato e zucchero).

Alla terza appartengono, particolarmente, sostanze organiche di origine animale e vegetale.

7) I diversi lotti di fabbricazione delle materie prime esaminate hanno presentato sovente ampie variazioni nel contenuto microbico, sia considerato come carica totale, sia come presenza di microrganismi patogeni o igienicamente indesiderati.

8) Differenze significative sono state anche rilevate nelle caratteristiche igieniche di materie prime provenienti da diversi fornitori. Proprio questa interessante constatazione ci ha spinto a compiere una indagine supplementare su 60 lotti di gelatina granulare e 15 di cacao amaro in polvere, ognuna di dette sostanze proveniente da tre diversi produttori. Come balza evidente dai risultati riportati nella Tab. 6, nel caso del cacao amaro i 5 campioni del fornitore «A» hanno presentato carica batterica superiore a 1.000 in tutti i casi, con l'isolamento di germi patogeni o indesiderati in ben 4 campioni. Caratteristiche igieniche diametralmente opposte hanno posseduto le 5 partite di cacao del fornitore «C», tutte con carica batterica non superiore al migliaio e esenti da microrganismi a significato igienico. Livelli igienicamente intermedi sono stati rilevati nei lotti del fornitore «B».

Anche per quanto concerne la gelatina i reperti microbiologici delle diverse partite hanno presentato una notevole variabilità: poco contaminati i lotti del fornitore «F», mediamente quelli del fornitore «E» e gravemente quelli del fornitore «D».

TABELLA 6

Caratteristiche igieniche di materie prime provenienti da diversi produttori

PRO- DUT- TORE	Cacao amaro polvere				PRO- DUT- TORE	Gelatina granulare			
	N. dei lotti	Carica batterica (germi/g)		N. di pre- senza ger- mi indesi- derati		N. dei lotti	Carica batterica (germi/g)		N. di pre- senza ger- mi indesi- derati
		$\leq 10^3$	$> 10^3$				$\leq 10^3$	$> 10^3$	
<i>A</i>	5	0	5	4	<i>D</i>	20	1	19	10
<i>B</i>	5	1	4	2	<i>E</i>	20	12	8	6
<i>C</i>	5	5	0	0	<i>F</i>	20	18	2	1

9) Le prove intese a rilevare le variazioni della carica batterica in materie prime di largo impiego farmaceutico (amido di mais, zucchero) conservate per 30 giorni nelle medesime condizioni igrometriche (U. rel. 60 %), ma a tre livelli di temperatura (15-22-37 °C) non hanno messo in evidenza (come risulta dalla Tab. 7) nessuna variazione nei campioni « chiusi » conservati a 15 e a 22 °C.

Incrementi sensibili si sono rilevati, invece, nei campioni tenuti aperti. I valori di questi aumenti sono del 170-180 % nell'amido e nello zucchero rispettivamente alla temperatura di conservazione di 15 °C; dell'800 % (amido)-860 % (zucchero), se conservati alla temperatura di 22 °C.

La conservazione alla temperatura di 37 °C ha determinato in tutti i campioni, sia chiusi sia aperti, un incremento molto cospicuo dei microrganismi contaminanti. L'aumento è stato dell'800 % (amido)-2.300 % (zucchero) nel caso di contenitori chiusi e superiore al 100.000 % nei campioni lasciati aperti.

TABELLA 7

Variazioni percentuali della carica batterica in amido di mais e zucchero in relazione alla temperatura, con umidità relativa 60 %

Condizioni di conservazione		Amido di mais (germi/g)			Zucchero (germi/g)		
Temperatura (°C)	Contenitore	Prove	Valore medio	Errore standard	Prove	Valore medio	Errore standard
15	Chiuso	N.			N.		
	Aperto	10	102	1,75	10	98	2,01
22	Chiuso	10	170	2,61	10	180	2,16
	Aperto	10	105	2,10	10	103	2,00
37	Chiuso	10	800	9,40	10	860	7,06
	Aperto	10	800	12,0	10	2300	31,0
		10	> 10 ⁵	—	10	> 10 ⁵	—

10) Per quanto riguarda l'influenza del grado di umidità sulla carica microbica dell'amido di mais e dello zucchero conservati per 30 giorni alla temperatura di 22 °C a tre diversi livelli igrometrici (30-60-90 % U. rel.) non si è rilevata (Tab. 8) alcuna modifica nei campioni « chiusi » conservati fino al 60 % di umidità relativa. La carica microbica è invece aumentata

TABELLA 8

Variazioni percentuali della carica batterica in amido di mais e zucchero in relazione al grado igrometrico, a temperatura costante (22 °C)

Condizioni di conservazione		Amido di mais (germi/g)			Zucchero (germi/g)		
U rel (%)	Contenitori	Prove N.	Valore medio	Errore standard	Contenitori	Valore medio	Errore standard
30	Chiuso	10	101	1,90	10	102	1,89
	Aperto	10	550	8,70	10	210	4,81
60	Chiuso	10	115	2,03	10	98	2,04
	Aperto	10	900	10,9	10	930	10,1
90	Chiuso	10	1900	30,6	10	3500	49,0
	Aperto	10	> 10 ⁵	—	10	> 10 ⁵	—

nei campioni lasciati aperti e, precisamente, del 210 % (zucchero)-550 % (amido) in caso di conservazione con 30 % di umidità per salire al 900 % (amido)-930 % (zucchero) con il 60 % di umidità.

La conservazione in condizioni di elevata umidità (90 % U. rel.) ha portato la carica microbica a livelli elevatissimi: 1.900 % (amido)-3.500 % (zucchero) di aumento nei campioni « chiusi » ed oltre il 100.000 % di incremento quando essi sono stati mantenuti in contenitori « aperti ».

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Le principali conclusioni che si possono trarre dal complesso dei risultati ottenuti sono le seguenti:

1) Le diverse materie prime impiegate per la fabbricazione dei medicinali possono presentare un elevato grado di inquinamento batterico, con presenza anche di microrganismi patogeni o igienicamente indesiderati.

Poiché la presenza di questa microflora contaminante può condurre alla preparazione di farmaci pericolosi o facilmente alterabili, è opportuno che vengano eseguiti preventivi controlli microbiologici tanto sui principi attivi, quanto sugli eccipienti, al fine di escludere dal ciclo produttivo le sostanze igienicamente non idonee.

Tali controlli risultano particolarmente necessari nel caso che queste sostanze siano impiegate per la preparazione di farmaci (comprese, confetti, sospensioni, pomate ecc.) che generalmente non sono sottoposti o mal si prestano a trattamenti antibatterici.

2) I produttori di materie prime, d'altro canto, dovrebbero applicare nei cicli di produzione, nonché nella fase di conservazione, precauzioni atte a ridurre al minimo le contaminazioni batteriche.

Sarebbe auspicabile inoltre che i produttori verificassero con regolari esami microbiologici l'efficacia delle precauzioni attuate.

3) Non solo i produttori di materie prime, ma anche i grossisti e i depositari dovrebbero osservare rigorosamente le norme atte alla miglior conservazione delle materie prime.

In base anche alle nostre ricerche, sono particolarmente determinanti il grado igrometrico, la temperatura e l'impiego di contenitori di adeguata sicurezza ed ermeticità. Le pessime condizioni di conservazione possono trasformare prodotti igienicamente idonei in prodotti inaccettabili.

4) L'industria farmaceutica, ovviamente, dovrà praticare una accurata ed oculata conservazione delle materie prime giacenti presso i propri magazzini, eseguendo non solo alla consegna, ma altresì al momento dell'impiego un controllo microbiologico quanti-qualitativo.

5) L'impiego di materie prime con buone caratteristiche microbiologiche, in unione ad una lavorazione industriale condotta secondo rigide norme igieniche, consentirà di ottenere prodotti farmaceutici a bassa carica microbica ed esenti da microrganismi patogeni.

Ricevuto il 13 giugno 1977.

Accettato il 13 settembre 1977.

BIBLIOGRAFIA

1. WELCH, H., G. SLOCUM, & R. HERWICH. 1942. *J.A.M.A.* **120**: 361 (cit. da Dony, 1969).
2. SEVITT, S. 1949. Source of two hospital infected cases of tetanus. *Lancet*, **ii**: 1075-1078.
3. KALLINGS, L.O. & F. ERNERFELDT 1965. « Endbericht der Koniglichen Schwed. Medizin Kommission ». Stockholm.
4. DONY, J. 1965. *Pharm. Weekbl.* **100**: 70 (cit. da Penso, 1972).
5. KALLINGS, L.O., O. RINGERTZ, & L. SILVERSTOLPE. 1966. Microbiological contamination of medical preparations. *Acta Pharm. Suecica*, **3**: 219-228.

6. U.S. Depart. of Health, Educ. and Welfare. National Office of vital statistic. 1966. In: *Vital Statistic the U.S.* Vol. 15 Morbidity and Mortality-Weekly Report — Washington (D.C.) August 20 (Publ. n. 33), p. 282.
7. LANG, D.J., L.J. KUNZ, A.R. MARTIN, S.A. SCHROEDER, & L.A. THOMSON. 1967. Carmine as a source of nosocomial salmonellosis. *N. Engl. J. Med.* **276**: 829-832.
8. KOMARMY, L.E. R.E. OXLEY, & G. BRECHER. 1967. Hospital acquired salmonellosis traced to carmine dye capsules. *N. Engl. J. Med.* **276**: 850-852.
9. CROMPTON, D.O. 1962. *Australian J. Pharm. Act.* **30**: 30 (cit. da Penso, 1972).
10. ANONIMO. 1965. Infection at Birmingham and Midlands Eye Hospital. *Brit. Med. J.* **2B**: 1316.
11. KALLINGS, L.O., F. ERNERFELDT, & L. SILVERSTOLPE. 1966. Microbiological contamination of medical preparation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **66**: 287-294.
12. PHILLIPS, I. 1966. Postoperative respiratory tract infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet.* **i**: 903-904.
13. MERTZ, J.J., L. SCHARER & J.H. McCLEMENT. 1967. A Hospital outbreak of *K. pneumonia* from inhalation therapy with contaminated aerosol solutions. *Amer. Rev. Resp. Dis.* **95**: 454-460.
14. MITCHELL, R.G. & A.C. HAYWARD. 1966. Postoperative urinary tract infection caused by contaminated irrigating fluid. *Lancet.* **i**: 793-795.
15. MEYER, H. 1964. *Pharm. Praxis., Beilage Pharm.* **5**: 93 (cit. da Kallings, Ringertz e Silverstolpe, 1966).
16. FRENCH, W.N. 1967. *Med. Serv. J. Can.* **23**: 308 (cit. da Dony, 1969).
17. SYKES, G. 1968. Microbial contaminations in preparations for oral and tropical use. Report of the A.S.M. May. Nottingham.
18. DONY, J. 1969. Condition microbiologique du médicament non stérile. In: *Actes XIX Journées Pharmaceutiques Françaises*, pp. 25-37.
19. PENSO, G. 1972. Il contenuto microbico dei prodotti farmaceutici non iniettabili, PA/PH/SG(72)5 (non pubblicato).
20. Pharmacopea Nordica-Addendum. 31-12-1970/71. Stockholm.
21. Tschechoslowakischer Pharmkopoe. 1970. Ed. 3. (Ph Bs 3).
22. U.S. Pharmacopoeia. Ed. XIX. 1975. Mack Print. Co. (USA).
23. British Pharmacopoeia. 1973. W. Clowes Ltd., London.
24. Council of Europe, Comité de Sante Publique, Commission Europeenne de Pharmacopée-Sous-Groupe d'Experts n. 1 CM. 1975. Mémoire concernant les essais de contamination microbienne des produits pharmaceutiques non obligatoirement stériles. PA/PH/EXP 1 CM/T(74)3 2 Rev. (non pubblicato).
25. Relazione presentata al Consiglio Naz. di Sanità Svedese. 1965. *Documento S.I.S.F.* **3**.
26. PEDERSEN, A. & K. ULRICH. 1968. Microbial content in non-steril pharmaceuticals. *Dansk. Tidsskr. Farm.* **42**: 71-83.
27. HENNING, H.M. 1970. Die mikrobiologische prüfung von « nicht sterilen » pharmazeutischen preparaten auf keimzahl und keimart. *Pharm. Ind.* **32**: 253-259.

28. SYKES, G. 1971. The control of microbial contamination in pharmaceutical products for oral and topical use. *Raw Materials. J. Mond. Pharm.* 1-2: 14-21.
29. BUHLMANN, X., M. GAY, W. HANERT, W. HECKER, W. SACKMANN, & I. SCHILLER. 1972. Prüfung pharmazeutischer hilfsmittel auf mikrobielle kontamination. *Pharm. Ind.* 34: 562-575.
30. GALLIEN, R. 1972. Mikrobielle kontamination von fertigerzeugnissen und rohmittel-Problematisierung, ergebnisse, schlussfolgerungen. *Pharm. Ind.* 34: 929-932.
31. BUHLMANN, X. 1968. Method for microbiological testing of non-steril pharmaceutical. *Appl. Microbiol.* 16: 1919-1923.
32. BUHLMANN, X., M. GAY, H. HESS, & P. KNUESSEL. 1968. Eine methode zur prüfung von nicht sterilen therapeutischen erzeugnissen auf keimgehalt. *Pharm. Acta Helv.* 43: 374-381.
33. KRUGER, D. 1973. Ein beitrag zum thema der mikrobiellen kontamination von wirk- und hilfsmitteln. *Pharm. Ind.* 35: 569-577.
34. SPEISER, P. 1973. Wissenschaftliche anforderungen an sterile präparate. *Pharm. Acta Helv.* 48: 63-82.
35. KRUGER, D. 1974. Mikrobielle reinheit von arzneimitteln. *Pharm. Ztg.* 119: 2021-2029.
36. WILDMANN, A. & R.J. CROOME. 1975. Gelatine-Mikrobiologischer status. *Pharm. Ind.* 37: 651-654.
37. GAY, M. 1975. Mikrobiologische reinheit nichtsteriler pharmazeutischer erzeugnisse: Entwicklung der vorschriften und prüfmethoden. *Schweiz. Apoth. Ztg.* 113: 441-449.
38. NEGRETTO, F. & E. BONOMO. 1975. Indagine sulle caratteristiche igieniche di materie prime ed eccipienti per la preparazione di prodotti medicinali solidi. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* XXIX: 708-711.
39. ZUGER, R. 1976. Mikrobiologische aspekten bei der überprüfung flüssiger arzneimittel. *Pharm. Ind.* 38: 899-902.
40. HEIN, H. & M. MIKLOVICH. 1976. Untersuchungen über den keimgehalt einiger zur herstellung von arzneimitteln benutzter rohmittel- und hilfsmittel. *Pharm. Ind.* 38: 407-411.
41. U.S. Military Standard 105 D. 1963. Dept. of Defense (U.S.A.).
42. F.I.P. 1975. Methodes suggerées pour la numération des germes vivants dans les préparations non obligatoirement stériles. *R. Sci. Tech. Pharm.* T.4: 231-233.
43. F.I.P. 1975. Pureté microbiologique des formes pharmaceutiques non obligatoirement stériles. *Pharm. Acta Helv.* 50: 285-292.
44. MOSSEL, D.A.A., R. VISSER & A.M.R. CORNELIJSSEN. 1963. The examination of foods for *Enterobacteriaceae* using a test of the type generally adopted for the detection of *Salmonellae*. *J. Appl. Bacteriol.* 26: 444-452.
45. REDYS, J., K. ROSS & J. BORMANN. 1960. Inhibition of common antigen fluorescence in grouping *Streptococci* by the fluorescent antibody method. *J. Bacteriol.* 80: 823-829.
46. MOSSEL, D.A.A. & H. POW. 1973. Studies on the suitability of sulphite-cycloserine-agar for the enumeration of *Clostridium perfringens* in food and water. *Zentralbl. Bacteriol. Abt. I (Orig. A)*, 223: 559-561.
47. F.D.A. 1976. *Bacteriological analytical manual*. A.O.A.C. Publ., Washington.