

**RAPPORTO DI PROVA EN 1040  
ATTIVITÀ BATTERICIDA**

**EN 1040: 2005**

**Disinfettanti chimici e antisettici - Test di sospensione quantitativa per la  
valutazione dell'attività battericida di base di disinfettanti chimici e antisettici  
Metodo di prova e requisiti (fase 1)**

***Prodotto***

***MANIGEL***

**Committente:**

**PIF ITALIA SRL**

Via Bruno Slongo n.15, Venezia 30173,

P.IVA 04203260270

**Per conto di:**

**BERNI GROUP SRL**

**Data ricevimento campione: 25.06.2020**

**Codice accettazione: 34-1040-F/20**

**Data inizio test: 29.06.2020**

**Data fine test: 01.07.2020**

**Data report: 04.07.2020**

## Introduzione

**La presente norma europea specifica un test di sospensione per stabilire se un disinfettante chimico o un antisettico ha o meno un'attività battericida di base nei campi descritti nell'ambito.**

Un campione del prodotto così come consegnato (massima concentrazione del test = 80%) e / o diluito con acqua viene aggiunto a una sospensione di prova di batteri. **La miscela viene mantenuta a (20 ±1) ° C per 1 min.** Alla fine di questo tempo di contatto, viene presa un'aliquota; l'attività battericida e / o batteriostatica in questa porzione viene immediatamente neutralizzata o soppressa con un metodo validato. Il metodo di scelta è la neutralizzazione della diluizione o la filtrazione su membrana. Vengono determinati il numero di batteri sopravvissuti in ciascun campione e viene calcolata la riduzione.

Il test viene eseguito utilizzando *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* come organismi di prova (condizioni di prova obbligatorie).

## Materiali e reagenti

L'attività battericida viene valutata utilizzando i seguenti ceppi come organismi di prova (condizione obbligatoria):

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

1) I numeri ATCC sono i numeri di raccolta dei ceppi forniti dalla American Type Culture Collection (ATCC).

La temperatura di incubazione richiesta per questi organismi di prova è (37 ±1) ° C. La stessa temperatura (37 °C) viene utilizzata per tutte le incubazioni eseguite durante una prova e il suo controllo e validazione.

TSA= triptone soy agar come terreno di coltura batterica

## Sospensione di prova (“N”)

Regolare il numero di cellule nella sospensione su  $1,5 \times 10^8$  ufc / ml su  $5 \times 10^8$  ufc / ml usando il diluente. Mantenere questa sospensione di prova a bagnomaria alla temperatura di prova e utilizzare entro 2 ore.

### **Sospensione della convalida ("Nv")**

Per preparare la sospensione di validazione, diluire la sospensione di prova con il diluente per ottenere da  $3,0 \times 10^2$  ufc / ml a  $1,6 \times 10^3$  ufc / ml.

### **Incubazione e conteggio del test e delle sospensioni di validazione**

- a) Incubare le piastre per 20 ore a 24 ore.
- b) Scartare eventuali piastre Petri che non sono numerabili per qualsiasi motivo. Contare le piastre e determinare il numero di ufc. Incubare le piastre per altre 20 ore a 24 ore.
- c) Se il numero è aumentato, utilizzare solo il numero più alto per un'ulteriore valutazione.
- d) Calcola il numero di ufc / ml nella sospensione di prova "N" e nella sospensione di validazione "Nv"

### **Procedura per la valutazione dell'attività battericida del prodotto**

Condizioni sperimentali

a) temperatura T (in ° C):

- la temperatura è  $T = 20 \text{ ° C} \pm 1 \text{ ° C}$  (condizione obbligatoria).

b) tempo di contatto t (in min):

- il tempo di contatto da testare è  $t = 1 \text{ min}$  (condizione facoltativa);

### **Scelta del metodo di prova (filtrazione su membrana) Metodo di filtrazione su membrana**

La prova e le procedure di controllo e convalida sono eseguite in parallelo e separatamente per ciascuna condizione sperimentale. Ciascun apparato di filtrazione a membrana è dotato di una membrana con dimensione dei pori di  $0,45\mu\text{m}$  e diametro da 47 mm a 50 mm e riempita con 50 ml di liquido di lavaggio.

### **Test "Na" (Determinazione delle concentrazioni battericide)**

La procedura per determinare le concentrazioni battericide è la seguente.

a) Alla fine di t si preleva un campione di 0,1 ml della miscela di prova "Na" in duplicato e si trasferisce ogni campione da 0,1 ml in un apparecchio di filtrazione a membrana separato. Si filtra immediatamente. Filtrare poi almeno 150 ml ma non più di 500 ml di liquido di lavaggio. Quindi si trasferire ciascuna delle membrane sulla superficie di piastre TSA separate.

### **Controllo delle condizioni sperimentali "A" (Convalida delle condizioni sperimentali selezionate e / o verifica dell'assenza di effetti letali nelle condizioni di prova)**

Per convalidare le condizioni sperimentali selezionate e / o verificare l'assenza di effetti letali nelle condizioni del test, la procedura è la seguente.

a) Alla fine di t, si preleva in duplicato un campione di 1,0 ml di questa miscela "A" e si trasferisce ogni campione da 1,0 ml in un apparato di filtrazione su membrana separato. Si filtra immediatamente e si aggiungono 50 ml di acqua. Quindi si trasferire ciascuna delle membrane sulla superficie di piastre TSA, le piastre vengono incubate secondo i tempi e la Temperatura stabiliti dalla norma.

### **Controllo della filtrazione "B" (Convalida della procedura di filtrazione). Per convalidare la procedura di filtrazione, procedere come segue.**

Si prelevano 0,1 ml della sospensione di validazione in duplicato (sospensione per il controllo "B") e si trasferisce ogni campione da 0,1 ml in un apparato di filtrazione su membrana separato. Si filtra immediatamente, poi si filtrare il liquido di lavaggio nello stesso modo del test.

Quindi si trasferisce ciascuna delle membrane sulla superficie di piastre TSA separate, le piastre vengono incubate secondo i tempi e la Temperatura stabiliti dalla norma.

### **Convalida del metodo "C" (Convalida del metodo di filtrazione su membrana o conteggio dei batteri sulle membrane che sono stati precedentemente in contatto con il prodotto)**

Per la convalida del metodo di filtrazione su membrana che sono stati precedentemente in contatto con il prodotto, la procedura è la seguente.

a) Alla fine di t, si preleva in duplicato 0,1 ml della miscela di validazione "C" e si trasferisce ciascun campione da 0,1 ml in un'apparecchiatura di filtrazione a membrana separata. Si filtra immediatamente. Quindi si coprono le membrane con 50 ml di liquido di lavaggio e si aggiungono 0,1 ml della sospensione di validazione. Si filtra immediatamente di nuovo e inoltre si filtrano altri

50 ml di acqua. Quindi si trasferire ciascuna delle membrane sulla superficie di piastre TSA separate, le piastre vengono incubate secondo i tempi e la Temperatura stabiliti dalla norma.

**Per l'incubazione e il conteggio della miscela di prova e delle miscele di controllo e validazione, la procedura è la seguente.**

- a) Le piastre vengono incubate per 20 ore a 24 ore.
- b) Si contano i batteri cresciuti sulle piastre e si determina il numero di unità formanti colonie. Le piastre vengono incubate per altre 20-24 ore.
- c) Si calcola il numero di ufc / ml nella miscela di prova Na e nelle miscele di validazione A, B e C utilizzando il metodo indicato.

### Dati sperimentali e calcolo

N e Nv rappresentano le sospensioni batteriche, Na rappresenta la miscela di test battericida, A (controllo delle condizioni sperimentali), B (controllo della filtrazione), C (validazione del metodo). Rappresentano le diverse miscele del test di controllo N, Nv, N0, Nv0, Na e A, B e C rappresentano il numero di cellule contate per ml nelle diverse miscele di test secondo la Tabella 1.

Tabella 1

	Numero di cellule per ml nelle sospensioni	Numero di cellule per ml nelle miscele di prova all'inizio del tempo di contatto (tempo=0)	Numero di sopravvissuti per ml nelle miscele di prova al termine del tempo di contatto t, 5m
<b>TEST</b>	N= Sospensioni batteriche	N0 (= N/10)	Na prima della filtrazione
<b>CONTROLLI</b>	Nv= Validazione delle sospensioni	Nv0 (= Nv/10)	A, B, C

## Valori Vc

**Tutti i dati sperimentali sono riportati come valori Vc:**

$$N0 (= N / 10) \quad Nv0 (= Nv / 10)$$

**Na (prima della filtrazione)**

**A, B, C**

**Nel metodo di filtrazione su membrana, un valore Vc è il numero di unità formanti colonie contate per 0,1 ml di campione di miscela di prova Na e per 1,0 ml di campione nei controlli.**

$$N = 1,5 \times 10^8 \text{ e } 5 \times 10^8 \text{ con: } (8,17 \leq \lg N \leq 8,70)$$

$$N0 = 1,5 \times 10^7 \text{ e } 5 \times 10^7 \text{ con: } (7,17 \leq \lg N0 \leq 7,70)$$

$$Nv = 3 \times 10^2 \text{ e } 1,6 \times 10^3 \text{ con: } (7,17 \leq \lg N0 \leq 7,70)$$

$$Nv0 = 3,0 \times 10^1 \text{ e } 1,6 \times 10^2$$

$$A, B, C: = - 0,5 \times Nv0$$

**La riduzione ( $R = N0 / Na$ ) è espressa in logaritmo.**

Per ciascun organismo di prova si registra il numero di ufc / ml nella sospensione di prova N e nella prova Na.

SI calcola Na usando la seguente equazione:

$$Na = 10c / n \text{ dove:}$$

c è la somma dei valori Vc presi in considerazione;

n è il numero di valori Vc presi in considerazione.

$$R = N0 / Na$$

Per ogni concentrazione di prodotto e ogni condizione sperimentale, si calcola e si registra separatamente la riduzione del log decimale (lg) usando l'equazione:

$$\lg R = \lg N0 - \lg Na$$

<b>Microrganismi</b>	<b>T<sub>0</sub> Inoculo iniziale</b>	<b>T<sub>0+</sub> dopo contatto con il prodotto da testare</b>
<b>Stafilococcus aureus</b>	<b>1,5·10<sup>8</sup></b>	<b>2</b>
<b>Pseudomonas aeruginosa</b>	<b>1,5·10<sup>8</sup></b>	<b>3</b>

I dati esprimono le ufc relative ad 1g di prodotto

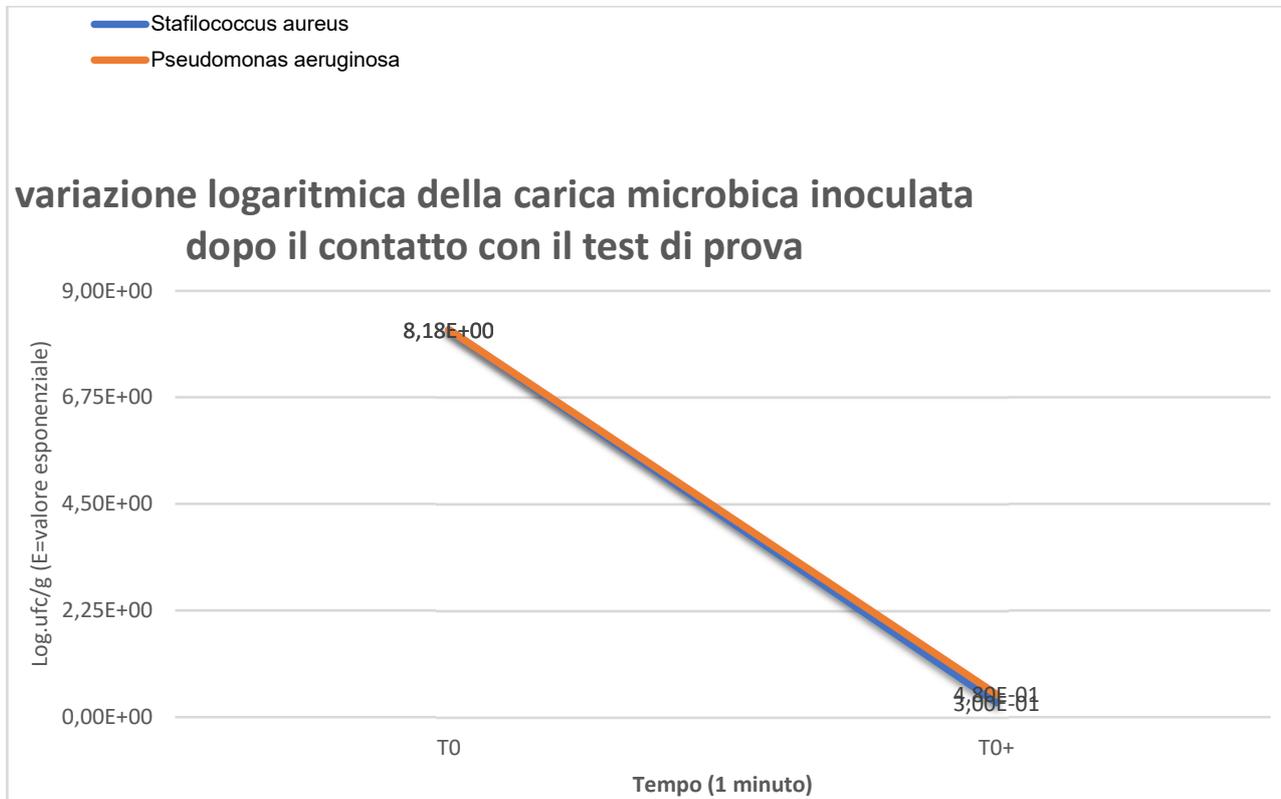
T tempo di analisi

#### TABELLA DELLA PERCENTUALE DI RIDUZIONE MICROBICA

<b>Microrganismi microorganisms</b>	<b>test/Test</b>	<b>% RIDUZIONE LOG</b>	
		<b>T<sub>0</sub> senza contatto con il prodotto</b>	<b>T<sub>0+</sub> con contatto con il prodotto</b>
<b>Stafilococcus aureus (G+) ATCC 8739</b>		<b>≥ 8 Log</b>	<b>≥ 7 Log</b>
<b>Pseudomonas aeruginosa (G-) ATCC 9027</b>		<b>≥ 8 Log</b>	<b>≥ 7 Log</b>

I dati esprimono la percentuale (%) di riduzione microbica in LOG in funzione del tempo di contatto (1m) alle condizioni di temperatura di 20°C con il prodotto da testare.

## GRAFICO



### LEGENDA:

ASSE DELLE ASCISSE= TEMPO DI ESECUZIONE DEL TEST

T0= TEMPO INIZIALE INOCULO

T0+= TEMPO DOPO IL CONTATTO CON IL PRODOTTO

ASSE DELLE ORDINATE=LOG ufc/g (unità formanti colonia relative a 1g o ml di prodotto espresse in valore logaritmico-numero scientifico E= esponenziale)

LEGENDA: LOG ufc/g unità formanti colonia relative ad 1 g o ml di prodotto espresse in valore logaritmo (numero scientifico E= esponenziale)

**Conclusione:**

**Si ritiene che il prodotto:**

***MANIGEL***

**ha superato la norma EN 1040 per l'attività battericida in quanto ha dimostrato una riduzione di almeno 5 log in una delle condizioni di prova definite dalla presente norma europea.**

**Il seguente test evidenzia e supporta il potere “igienizzante” del prodotto cosmetico.**

Questo documento, prodotto elettronicamente, è valido senza firma e costituisce copia esatta dell'originale.