

VALUTAZIONE EFFICACIA nei confronti di ceppi batterici e ceppi fungini

COD. LAB.: 1611301

Data report: 23/12/2016
Revisione: 20/01/2017

Oggetto: Valutazione “*in vitro*” dell’ attività antimicrobica nei confronti dei microorganismi

PRODOTTO / PRODUCT:

PRONTOIGIENE
Soluzione igienizzante specifico per superfici

COMMITTENTE:

BENSOS di Silvia Palladini & c. s.a.s.
Via Fibbia 8
25089 Villanova sul Clisi (BS)

Ricevimento campioni: 05/12/2016

Data inizio analisi/ *Beginning Date analysis*: 12/12/2016
Data fine analisi / *End date analysis*: 23/12/2016

in collaborazione con
prof. P.G.Balboni Università degli Studi
di Ferrara_Microbiologia

1. Metodo dell'efficacia inibente “*in vitro*” nei confronti dei microorganismi.

Il metodo è basato su una prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività battericida di prodotti ad attività igienizzante, disinfettanti chimici e/o antisettici usati in campo alimentare, industriale, domestico e nelle collettività.

The method include a quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of sanitizing product, chemical disinfectants and/ or antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas.

2.Scopo Del Test / Purpose Of The Test

Il metodo in sospensione è un metodo adeguato per dimostrare e per valutare l'efficacia antimicrobica di un prodotto ad azione inibente la crescita microbica.

Il metodo di prova è applicato ai disinfettanti chimici ed antisettici e descrive un metodo di prova in sospensione per determinare se un disinfettante chimico o un antisettico, presenta o no un'attività battericida e/o fungicida nei campi di applicazione precedentemente indicate.

The method is applied to chemical disinfectants and antiseptics and determine the methods to evaluate the bactericidal efficacy and/or fungicidal activity of chemical disinfectants and antiseptics in the area described in the scope.

3.Termini E Definizioni / Terms And Definitions

Prodotto (per disinfezione chimica e/o antisepsi): Agente chimico, o formulazione chimica, usato come disinfettante chimico o antisettico.

Product (for chemical disinfection and/or antiseptics): chemical agent or formulation used as a chemical disinfectant or antiseptic.

Battericida: Prodotto che, in condizioni definite, è in grado di uccidere le forme vegetative batteriche. / *Product which kills vegetative under experimental conditions.*

Adjective: bactericidal.

Attività battericida: Capacità del prodotto di dare luogo ad una riduzione di almeno 10^5 nel numero di cellule batteriche vitali appartenenti ai ceppi di riferimento di *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* in condizioni sperimentali standard “*in vitro*”.

Bactericidal activity

capability of a product to produce at least a 10^5 reduction in the number of viable bacterial cells belonging to reference strains of Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, and Staphylococcus aureus under standard experimental conditions “in vitro”.

Fungicida: Prodotto in grado di uccidere i funghi e le relative spore in condizioni definite.

Product which kills vegetative and the fungal spores under experimental conditions.

Adjective: Fungicidal.

in collaborazione con
prof. P.G.Balboni Università degli Studi
di Ferrara_Microbiologia

Attività fungicida: Capacità del prodotto di dare luogo ad una riduzione di almeno 10^4 nel numero di cellule vitali di lievito e di spore di muffa appartenenti rispettivamente alle specie di riferimento di *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger* in condizioni sperimentali standard "in vitro".

Fungicidal activity

*capability of a product to produce at least a 10^4 reduction in the number of viable yeast cells and fungal spores belonging to reference strains of *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger* under standard experimental conditions "in vitro".*

4.Fasi del Test

Le fasi procedurali consistono in:

- ✓ Conta microbica preliminare sui campioni da esaminare
- ✓ Preparazione dei microrganismi per l'inoculo
- ✓ Inoculo dei campioni
- ✓ Controllo della sopravvivenza dei microrganismi dopo il tempo di contatto di prova
- ✓ Valutazione dei risultati
- ✓ Convalida neutralizzante

5.Procedura

5.1. Condizioni Sperimentali / *Experimental Conditions* Parametri Sperimentali / *Experimentale Parameters*

Temperatura test: è stato eseguito a $+20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. / Test temperature: $+20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Concentrazione test: / Test concentration:

- 100%

Tempo di contatto:

- 15 minuti

Periodo di Analisi:

Ricevimento campioni: 05/12/2016

Data inizio analisi/ *Beginning Date analysis:* 12/12/2016

Data fine analisi / *End date analysis:* 23/12/2016

in collaborazione con
prof. P.G.Balboni Università degli Studi
di Ferrara_Microbiologia

5.2. Microrganismi utilizzati ATCC (American Type Collection Control):

Sono stati utilizzati i batteri seguenti:

The bactericidal activity was evaluated using the following test bacteria:

BATTERI / BACTERIA:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442*;
 - *Escherichia coli* ATCC 10536*;
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 6538*;
- *ATCC (American Type Culture Collections).

Sono stati utilizzate cellule vegetative di *Candida albicans* e spore di *Aspergillus niger* dei seguenti miceti:

LIEVITO / YEAST:

- *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601*;

MUFFE / MOLDS:

- *Aspergillus niger* ATCC 16404*.
- *ATCC (American Type Culture Collections).

The fungicidal activity shall be evaluated using the following two test organisms:

- *Candida albicans* (vegetative cells);
- *Aspergillus niger* (spores).

5.3. Materiali E Reagenti / Reagents And Material

TERRENO DI CULTURA / MEDIA

Per la conservazione dei ceppi batterici e per la determinazione della conta delle unità vitali.
For the conservation of bacterial strain and the determination of the count totale viable.

Per batteri / *For bacteria:*

Tryptone Soy Agar (TSA)

Composizione:

Triptone, digestione pancreatica di caseina 15,0 g; Peptone di soia, digestione papainica di farina di soia 5,0 g; NaCl 5,0 g; agar 15,0 g in 1000 ml in acqua distillata esente da pirogeni. Sterilizzazione in autoclave. Controllo del pH a $7,2 \pm 0,2$ a 20 ± 1 °C.

Tryptone Soya Agar (TSA) is used for counting of viable bacteria strains:

Tryptone soya agar, consisting of: Tryptone, pancreatic digest of casein 15,0 g; Soya peptone, papaic digest of soybean meal 5,0 g; Sodium chloride (NaCl) 5,0 g; Agar 15,0 g and Water to 1 000,0 ml. Sterilize in the autoclave. pH control at $7,2 \pm 0,2$ at 20 ± 1 °C.

in collaborazione con
prof. P.G.Balboni Università degli Studi
di Ferrara_Microbiologia

Per i miceti:

Agar – estratto di malto (Malt Extract Agar: MEA)

MEA è stato utilizzato per la conservazione dei ceppi fungini e per la determinazione della conta delle unità vitali. Composizione:

Maltosio 30,0 g; peptone di soia (peptocomplex) 3,0 g; Destrina 2,5 gr, glicerolo 1,0 g and agar 15,0 g in 1000 ml in acqua distillata esente da pirogeni. Sterilizzazione in autoclave. Controllo del pH a $5,6 \pm 0,2$ a 20 ± 1 °C.

*Malt extract agar (MEA) is used for counting of viable fungi and yeast strains, consisting of: Malt extract 30,0 g; Soya peptone (peptocomplex) 3,0 g; Dextrin 2,5 g; Glycerol 1,0 g and Agar 15,0 g in 1000 ml distilled water
Sterilize in the autoclave. pH control at $5,6 \pm 0,2$ at 20 ± 1 °C.*

Diluente / Diluent

Soluzione di cloruro di sodio triptone costituita da:

NaCl 8,5 g; Triptone, digestione pancreatica di caseina 1,0 g in 1000 ml in acqua distillata esente da pirogeni.

Controllo del pH = $7,0 \pm 0,2$ a 20 °C. Sterilizzazione in autoclave.

Tryptone sodium chloride solution, consisting of:

Sodium chloride (NaCl) 8,5 g; Tryptone, pancreatic digest of casein 1,0 g g in 1000 ml distilled water pyrogens free.

pH control at $7,0 \pm 0,2$ at 20 ± 1 °C. Sterilize in the autoclave.

Neutralizzante / Neutralizer

Il neutralizzante è stato validato per il prodotto sottoposto a prova.

Composizione: Lecitina 10 g/l; Polisorbato 80 50 g/l; Tiosolfato di sodio 10 g/l; L-Histidina 0,25 g/l; Tampone fosfato 0,0025 ml/l 1 g/l e Acqua distillata a 1000 ml.

Controllo del pH a $7,0 \pm 0,2$ a 20 ± 1 °C. Sterilizzazione in autoclave

The neutralizer has been validated for the test product being tested.

Composition: Lecithin , 10 g/l; Polysorbate 80 50 g/l; Sodium thiosulphae, 10 g/l; L-Histidine 0,25 g/l; Phosphate buffer 0.0025 ml/l and Distilled water to 1000 ml.

pH control at $7,0 \pm 0,2$ AT 20 ± 1 C. Sterilize in the autoclave.

Tecnica analitica: tecnica di semina in inclusione in piastra Petri.

Analytical technique: seeding pour plate technique in Petri dish.

6. Esecuzione del Saggio (Na): Metodo Diluizione – Neutralizzazione

Per ogni ceppo batterico e per ogni ceppo fungino, separatamente, è stata allestita una provetta contenente 1 ml di *sospensione microbica di prova* avente una concentrazione tra $1,5 \times 10^6$ e $5,0 \times 10^6$ ufc/ml per i batteri e di $1,5 \times 10^5$ e $5,0 \times 10^5$ ufc/ml per i miceti, alla temperatura prevista dal test di $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Sono stati aggiunti 8,0 ml di soluzione del prodotto in esame e dopo agitazione lasciati a contatto per il tempo di contatto di prova di 15 min \pm 10 s, a $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Dopo il tempo di contatto, è stato prelevato, in doppio, 1 ml di miscela test e sono stati aggiunti 8,0 ml di neutralizzante e 1,0 ml di acqua. Dopo il tempo di neutralizzazione di 5 min. \pm 10 s, la miscela è stata diluita con diluente con diluizioni decimali seriali da 10^{-1} fino a 10^{-3} . È stato prelevato 1 ml, in doppio, dalla miscela e dalle sue diluizioni e posto in piastre Petri per effettuare un conteggio per inclusione in TSA per i batteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e in MEA per i miceti *Saccharomyces cerevisiae* ed *Aspergillus niger*.

Condizioni di incubazione: Le piastre sono state incubate a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ per 48 h \div 96 h. Dopo incubazione è stato quindi determinato il numero (Vc) di unità formanti colonie/piastra per ogni diluizione, calcolando il valore della miscela di prova (Na).

Test "Na" – Determination of Bactericidal Activity Dilution-Neutralization Method

The procedure for determining bactericidal concentrations is as follows:

a) Pipette 1,0 ml of the test suspension into a tube. Add 8,0 ml of one of the product test solutions. Restart the stopwatch at the beginning of the addition. Mix and place the tube at $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for the chosen contact time t (15 minutes at $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$). Just before the end of t , mix again.

b) At the end of t , take a 1,0 ml sample of the test mixture "Na" and transfer into a tube containing 8,0 ml neutralizer and 1,0 ml water. Mix and place in a water bath controlled at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. After a neutralization time of 5 min \pm 10 s, mix and immediately take a sample of 1,0 ml of the neutralized test mixture "Na" (containing neutralizer, product test solution, interfering substance and test suspension) in duplicate and inoculate using the pour plate technique.

*Pour plate technique, pipette each 1,0 ml sample into separate Petri dishes and add 15 ml of melted TSA for bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* cooled to $45 \pm 1^\circ\text{C}$ and add 15 ml of melted MEA for fungi *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* cooled to $45 \pm 1^\circ\text{C}$*

After incubation at $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 \div 96 h. was count the plates and determine the number of colony forming units (Vc= colony number/plates).

Calculate the numbers of cfu/ml in the bacterial test mixture "Na".

7.Valutazione e Calcolo Dei Risultati

Calcolo dei Risultati / Calculation of the Results

Calcolo Delle Unità Vitali (UFC/ml) / Total Viable Count Calculation (CFU / ml)

Vc values: All experimental data are reported as Vc values: in the dilution-neutralization method (test and controls), a Vc value is the number of colony-forming units counted per 1,0 ml sample.

Il conteggio è stato effettuato usando il numero delle colonie contate su entrambe le piastre. Solo le piastre contenenti da 15 a 300 colonie sono state usate per il calcolo dei risultati. È accettata la deviazione standard del 10% pari al numero di colonie di 14 e 330. Nelle piastre dove il numero di colonie su tutte le piastre contate era maggiore di 330 è stato registrato il numero di ufc/ml come >330.

Count the plates and determine the number of cfu for each plate.

Only the plates containing from 15 to 300 colonies were used for the calculation of the results. It is accepted standard deviation of 10% equal to the number of colonies of 14 and 330. Note for each plate the exact number of colonies but record "> 330" for any counts higher than 330 and determine the Vc values.

Sospensione batterica / fungina test N e N₀ / Calculation of N and N₀

Il calcolo della conta totale viene effettuato nel seguente modo:

Since two dilutions of the test suspension are evaluated, calculate the number of cfu/ml as the weighted mean count using the following equation:

$$N(\text{ufc} / \text{ml}) = \frac{c}{(n1 + 0,1n2)d}$$

Dove:

N = numero di cellule per ml in sospensione di prova

c = somma delle colonie contate su entrambe le piastre

n1=numero delle piastre contate della più bassa diluizione (10⁻⁶)

n2= numero delle piastre contate della più alta diluizione (10⁻⁷)

d = fattore di diluizione

where:

N is the number of cells per ml in the test suspension.

c is the sum of Vc values taken into account;

n1 is the number of Vc values taken into account in the lower dilution, i.e. 10⁻⁶;

n2 is the number of Vc values taken into account in the higher dilution, i.e. 10⁻⁷;

d= dilution factor.

in collaborazione con
prof. P.G.Balboni Università degli Studi
di Ferrara_Microbiologia

8. Calcolo della Riduzione della Vitalità / Reduction

Per ciascun microrganismo di prova e concentrazione di prova del prodotto è stato calcolato la riduzione delle cellule vive nel seguente modo:

$$R = \frac{N_0}{N_a}$$

Dove / Were:

R = riduzione della vitalità / *Reduction*

N = conta della sospensione di prova / *Count of the test suspension (V_C-values)*

N_a = conta della miscela test al termine del tempo di contatto / *After contact time the count of the test mixture (V_C-values of the bactericidal efficacy)*

The reduction (R = N₀/N_a) is expressed in logarithm.

For each test organism record the number of cfu/ml in the test suspension N and the test N_a. Calculate N₀.

For each product concentration and each experimental condition, calculate and record the decimal log reduction (lg) separately using the equation:

$$lgR = lgN_0 - lgN_a$$

9. Convalida della non tossicità del neutralizzante / Neutralizer Control – Verification of the absence of toxicity of the neutralizer

1,0 ml di acqua è stato addizionato a 8,0 ml di neutralizzante e aggiunto 1,0 ml di sospensione batterica e fungina da $1,0 \times 10^2$ e $3,0 \times 10^3$ ufc/ml.

Dopo agitazione su Vortex e dopo il tempo di neutralizzazione di 5 minuti \pm 10 secondi, la miscela è stata diluita con diluente con diluizioni decimali seriali da 10^{-1} fino a 10^{-3} .

È stato prelevato 1 ml, in doppio, dalla miscela e dalle sue diluizioni e posto in piastre Petri per effettuare un conteggio per inclusione rispettivamente per i batteri in TSA e per i miceti in MEA.

Dopo incubazione a $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ per 48 h \div 96 h è stato quindi determinato il numero di unità formanti colonie/piastra per ogni diluizione, espresse in cfu/ml, verificando la non tossicità del neutralizzante utilizzato per il test "in vitro" di efficacia antimicrobica.

To verify the absence of toxicity of the neutralizer, the procedure is as follows.

Pipette 8,0 ml of the neutralizer and 1,0 ml of water into a tube.

Add 1,0 ml of the validation suspension. Start the stopwatch at the beginning of the addition, mix, and place the tube in a water bath controlled at $(20 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ for 5 min \pm 10 s. Just before the end of this time, mix. At the end of this time, take a sample of 1,0 ml of this mixture in duplicate and inoculate using the inclusion plate technique.

For incubation and counting: Incubate for bacteria in the TSA plates and for fungi in MEA at $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 h \div 96 h.

Calculate the numbers of cfu/ml to verify the non toxicity of the neutralizer used for the "in vitro" antimicrobial efficacy.

in collaborazione con
prof. P.G. Balboni Università degli Studi
di Ferrara_Microbiologia

10. Risultati / Results

Committente:

BENSOS di Silvia Palladini & c. s.a.s.
Via Fibbia 8
25089 Villanova sul Clisi (BS)

Prodotto:

PRONTOIGIENE
Soluzione igienizzante specifico per superfici

Tabella 1: Risultati espressi in cfu/g
Table 1: Results expressed in cfu / g

Microrganismi test			T _{Inoculo iniziale} N	T _{15 minuti} Na
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC	15442	3,0x10 ⁶	2,0x10 ³
<i>Escherichia coli</i>	ATCC	10536	3,2x10 ⁶	1,0x10 ³
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	6538	2,5x10 ⁶	1,0x10 ³
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC	2601	2,0x10 ⁵	5,0x10 ³
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC	16404	1,0x10 ⁵	6,0x10 ⁴

CFU / g: Unità formanti colonia relative ad 1 g di prodotto; T= intervallo di tempo di analisi.
TVC= Total Vital Count prima dell'esecuzione del test= <10 CFU/g.
CFU/ g : colony forming units relative to a gram (g) of product; T: time of analysis.
Total Vital Count [TVC] before the execution of the test= <10 CFU/g

Tabella 2: Valore Riduzione microbica (%):
Table 2: Microbial Reduction Value (%):

Tempo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
15 minuti	99,93%	99,96%	99,96%

Tempo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Aspergillus niger</i>
15 minuti	97,50%	40,00%

11. Conclusioni / Conclusions

Sulla base dei risultati ottenuti, rispettati i criteri di validità del saggio, la formulazione in esame, **"PRONTOIGIENE Soluzione igienizzante specifico per superfici" - BENSOS di Silvia Palladini & c. s.a.s.**, dopo il tempo di contatto di 15 minuti a 20°C, è risultata **BATTERICIDA**, nei confronti di *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; è risultata **LIEVITICIDA** nei confronti dei lieviti *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 ed è risultata **FUNGISTATICA** nei confronti delle muffe *Aspergillus niger* ATCC 16404.

According to the results obtained, the product "PRONTOIGIENE specific sanitizing solution for surfaces"- BENSOS di Silvia Palladini & c. s.a.s. possesses in 15 minute at 20°C BACTERICIDAL ACTIVITY for referenced strains Escherichia coli ATCC 10536, Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 and Staphylococcus aureus ATCC 6538; was found to YEASTICIDAL ACTIVITY against Saccharomyces cerevisiae yeast ATCC 2601 and found FUNGISTATIC ACTIVITY against the Aspergillus niger mould ATCC 16404.

Data certificate / Certificate date: 23/12/2016

Revisione: 20/01/2017

Firma del report: 23/01/2017



Prof. Pier Giorgio Balboni
(Firma / Signature) docente incaricato di insegnamento
(MED/07) come cultore della materia "Microbiologia" in
collaborazione con la Sezione di Microbiologia dell'Università
degli Studi di Ferrara