



RELAZIONE TECNICA/TECHNICAL REPORT N° 22-034405_0

Committente	<i>SHEIKO SA</i>
Customer	<i>VIA CANTONALE 19 6805 MEZZOVICO SVIZZERA</i>
Laboratorio di Analisi	<i>LabAnalysis s.r.l.</i>
Analysis laboratory	<i>Via Europa 5, 27041 Casanova Lonati (PV) Italy</i>
Campione	<i>Film di polietilene/Polyethylene film</i>
Sample	
Codice LabAnalysis	<i>FD-22-008450</i>
LabAnalysis code	

1. SOMMARIO/SUMMARY

L'attività antibatterica del campione è stata valutata come indicato nella norma di riferimento ISO 22196:2011 su 6 campioni "non trattati" e 3 campioni "trattati" con la sostanza attiva

I provini sono stati inoculati con una sospensione batterica a titolo noto e successivamente, gli inoculi sono stati ricoperti con una pellicola di 40 x 40 mm e incubati nelle condizioni sotto riportate.

I provini di 3 campioni non trattati sono stati analizzati subito dopo l'inoculo per valutare il recupero dei batteri. Al termine del tempo di contatto richiesto (T=24h), la procedura soprastante è stata ripetuta per determinare l'attività antibatterica del campione per i 3 campioni "trattati" e per i restanti 3 campioni "non trattati".

Tutti i risultati dei test effettuati sono riportati in dettaglio al capitolo 2.

The antibacterial activity of the sample has been evaluated as indicated in the reference standard ISO 22196:2011 on 6 "untreated" samples and 3 "treated" samples with the active substance

The specimens have been inoculated with a bacterial suspension of known titer and subsequently, the inoculums were covered with a 40 x 40 mm film and incubated under the conditions reported below.

The specimens of 3 untreated samples have been analyzed immediately after inoculation to evaluate the recovery of the bacteria. At the end of the required contact time (T=24h), the above procedure was repeated to determine the antibacterial activity of the sample for the 3 "treated" samples and for the remaining 3 "untreated" samples.

All the results of the tests carried out are detailed in chapter 2.

1.1 SISTEMA DI SAGGIO/ASSAY SYSTEM

Al fine di valutare l'attività antibatterica sono stati utilizzati i seguenti ceppi batterici

In order to evaluate the antibacterial activity, the following bacterial strains have been used

Microrganismi/ <i>Microrganisms</i>	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538P
<i>Escherichia coli</i>	8739

1.2 CONDIZIONI SPERIMENTALI/EXPERIMENTAL CONDITIONS

Il campione in esame è stato analizzato nelle condizioni riassunte nella tabella sotto:

The sample under examination has been analyzed under the conditions in the table below:

Dimensione del provino/Specimen size	25 cm ²
Concentrazione inoculo/Inoculum concentration	3,00E+5
Tempo di contatto/Time contact	24h
Condizioni di incubazione/Incubation condition	35°C HR >90%

1.3 PERIODO DELL'ANALISI/PERIOD OF ANALYSIS

Inizio Analisi/*Start test*: 05/07/2022

Fine Analisi/*End test*: 08/07/2022

1.4 ESECUZIONE DEL SAGGIO

Per la valutazione dell'attività battericida è stata impiegata una soluzione batterica a concentrazione nota ($3,00E+5$).

I provini sono stati inoculati con 0,4 ml della sospensione batterica e successivamente sono stati ricoperti con una pellicola di 40 x 40 mm e incubati per 24h ore a 35 °C e umidità relativa > 90%.

Subito dopo l'inoculo i provini di 3 campioni non trattati sono stati analizzati, aggiungendo 10 ml di brodo neutralizzante SCDLP e la risospensione batterica è stata titolata per valutare il recupero dei batteri.

Al termine del tempo di contatto richiesto ($T=24h$), la procedura sopra riportata è stata ripetuta per determinare l'attività battericida del campione per i 3 campioni "trattati" e per i restanti 3 campioni "non trattati".

La sospensione batterica è stata opportunamente diluita, piastrata su Agar in capsule Petri e incubata a (35 ± 1) °C per 48 h.

Dopo l'incubazione, sono state contate le colonie cresciute nella capsula Petri ed è stata valutata la riduzione logaritmica dei batteri vitali.

A bacterial solution of known concentration ($3.00E+5$) has been used to evaluate the antibacterial activity.

The specimens have been inoculated with 0.4 ml of the bacterial suspension and subsequently have been covered with a 40 x 40 mm film and incubated for 24 hours at 35 °C and relative humidity > 90%.

Immediately after inoculation, the specimens of 3 untreated samples have been analyzed, adding 10 ml of SCDLP neutralizing broth and the bacterial resuspension has been titrated to evaluate the recovery of the bacteria.

At the end of the required contact time ($T=24h$), the above procedure has been repeated to determine the antibacterial activity of the sample for the 3 "treated" samples and for the remaining 3 "untreated" samples.

The bacterial suspension has been suitably diluted, plated on Agar in Petri dishes and incubated at (35 ± 1) °C for 48 h.

After incubation, the colonies grown in the Petri dish have been counted and the log reduction of viable bacteria has been evaluated.

1.5 CALCOLO DELLE COLONIE VITALI/COUNT VIABLE BACTERIA

La conta delle colonie presenti sulla piastra è stata valutata secondo la seguente formula:

$$N = (100 \times C \times D \times V)/A$$

Dove:

- ✓ N è il numero di batteri vitali contati per cm²;
- ✓ C è il numero medio di colonie misurato sulle piastre preparate in duplicato;
- ✓ D è il fattore di diluizione;
- ✓ V è il volume, in ml, di SCDLP aggiunto al campione;
- ✓ A è la superficie, in mm², del film di copertura.

The count of the colonies present on the plate has been evaluated according to the following formula:

$$N = (100 \times C \times D \times V)/A$$

Where is it:

- *N is the number of viable bacteria counted per cm²;*
- *C is the average number of colonies measured on the plates prepared in duplicate;*
- *D is the dilution factor;*
- *V is the volume, in ml, of SCDLP added to the sample;*
- *A is the surface area, in mm², of the covering film.*

1.6 VALIDITA' DEL TEST/VALIDATION TEST

Il test è ritenuto valido in quanto sono state soddisfatte le condizioni sotto riportate:

- ✓ Il valore logaritmico del numero di batteri vitali recuperati immediatamente dopo l'inoculazione dai campioni di prova non trattati deve soddisfare il seguente requisito:

$$(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{media}}) \leq 0,2$$

Dove

L_{\max} è il logaritmo comune (cioè logaritmo in base 10) del numero massimo di batteri vitali trovati su un campione;

L_{\min} è il logaritmo comune del numero minimo di batteri vitali trovati su un campione;

L_{mean} è il logaritmo comune del numero medio di batteri vitali trovati sui campioni.

- ✓ Il numero medio di batteri vitali recuperati immediatamente dopo l'inoculazione dal test non trattato
i campioni devono essere compresi tra $6,2 \text{ E}+3 \text{ UFC/cm}^2$ e $2,5\text{E}+4 \text{ UFC/cm}^2$.
- ✓ Il numero di batteri vitali recuperati da ciascun campione di prova non trattato dopo incubazione per 24 ore non deve essere inferiore a $6,2\text{E}+1 \text{ UFC/cm}^2$.

The test is considered valid as the following conditions have been met:

- ✓ *The log value of the number of viable bacteria recovered immediately after inoculation from the untreated test samples must meet the following requirement:*

$$(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{mean}}) \leq 0.2$$

Where:

L_{\max} is the common logarithm (i.e. base 10 logarithm) of the maximum number of viable bacteria found on a sample;

L_{\min} is the common logarithm of the minimum number of viable bacteria found on a sample;

L_{mean} is the common logarithm of the mean number of viable bacteria found on the samples.

- ✓ *The mean number of viable bacteria recovered immediately after inoculation from the untreated testsamples must be between $6.2\text{E}+3 \text{ CFU/cm}^2$ and $2.5\text{E}+4 \text{ CFU/cm}^2$.*
- ✓ *The number of viable bacteria recovered from each untreated test sample after incubation for 24 hours should not be less than $6.2\text{E}+1 \text{ CFU/cm}^2$.*

1.7 CALCOLO DELLA ATTIVITA' ANTIBATTERICA/ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Il calcolo dell'attività antibatterica viene eseguito utilizzando l'equazione ed esprimendo il risultato con una cifra decimale.

$$R = U_t - A_t$$

Dove

- ✓ R è l'attività antibatterica;
- ✓ U_t è la media del logaritmo comune del numero di batteri vitali, in cellule/cm², recuperati dai provini non trattati dopo 24 h;
- ✓ A_t è la media del logaritmo comune del numero di batteri vitali, in cellule/cm², recuperati dai provini trattati dopo 24 h.

The calculation of the antibacterial activity is performed using the equation and expressing the result to one decimal place.

$$R = U_t - A_t$$

Where:

- ✓ *R is the antibacterial activity;*
- ✓ *U_t is the mean of the common logarithm of the number of viable bacteria, in cells/cm², recovered from untreated specimens after 24 h;*
- ✓ *A_t is the mean of the common logarithm of the number of viable bacteria, in cells/cm², recovered from the treated specimens after 24 h.*

2. RISULTATI/RESULTS

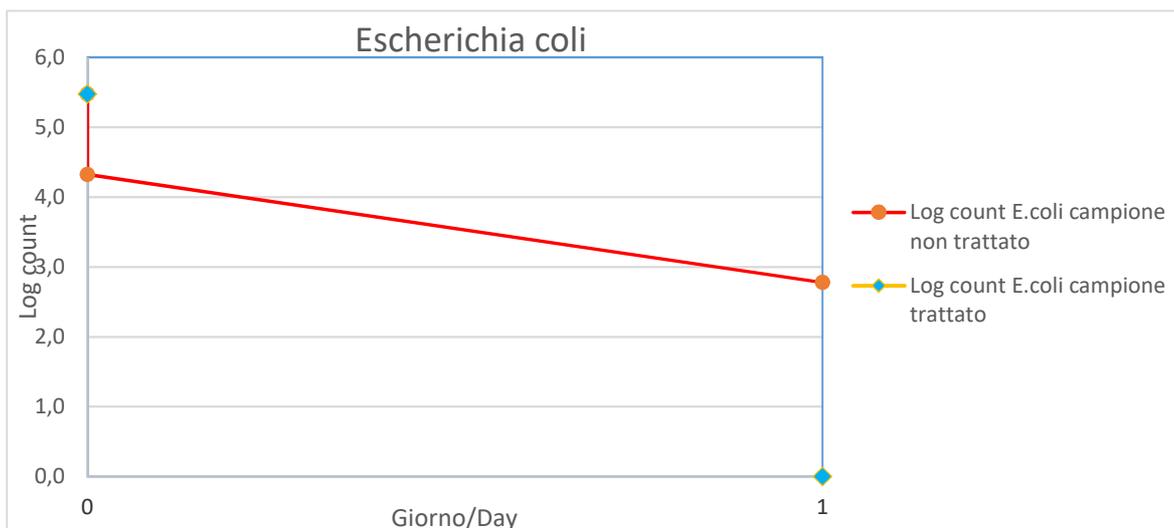
2.1 RISULTATI STAPHYLOCOCCUS AUREUS/RESULTS STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Parametro/Parameters	Risultato/Result	
attività antibatterica/antibacterial activity (R)	2,4	
Dettagli metodo/Method details		
film di copertura/cover film		Polietilene/Polyethylene 4 cm x 4 cm
dimensione del provino/specimen size	cm ²	25
batteri vitali nell'inoculo del test/viable bacteria in the test inoculum	UFC/ml	3,00E+05
batteri vitali nel campione non trattato immediatamente dopo l'incubazione <i>viable bacteria in the untreated test sample immediately after incubation</i>	UFC/cm ²	1,60E+04
logaritmo medio dei batteri vitali nel campione non trattato immediatamente dopo l'incubazione <i>common logarithm of the viable bacteria in the untreated sample immediately after incubation</i>	-	4,20
batteri vitali nel campione non trattato dopo 24 ore di incubazione <i>viable bacteria in the untreated sample after 24 hours of incubation</i>	UFC/cm ²	260
logaritmo medio dei batteri vitali nel campione non trattato dopo 24 ore di incubazione <i>common logarithm of the viable bacteria in the untreated sample after 24 hours of incubation</i>	-	2,41
batteri vitali nel campione trattato dopo 24 ore di incubazione <i>viable bacteria in the treated sample after 24 hours of incubation</i>	UFC/cm ²	1
logaritmo medio batteri vitali nel campione trattato dopo 24 ore di incubazione <i>common logarithm of the viable bacteria in the treated test sample after 24 hours of incubation</i>	-	0,00
volume dell'inoculo utilizzato/volume inoculated used	ml	0,4

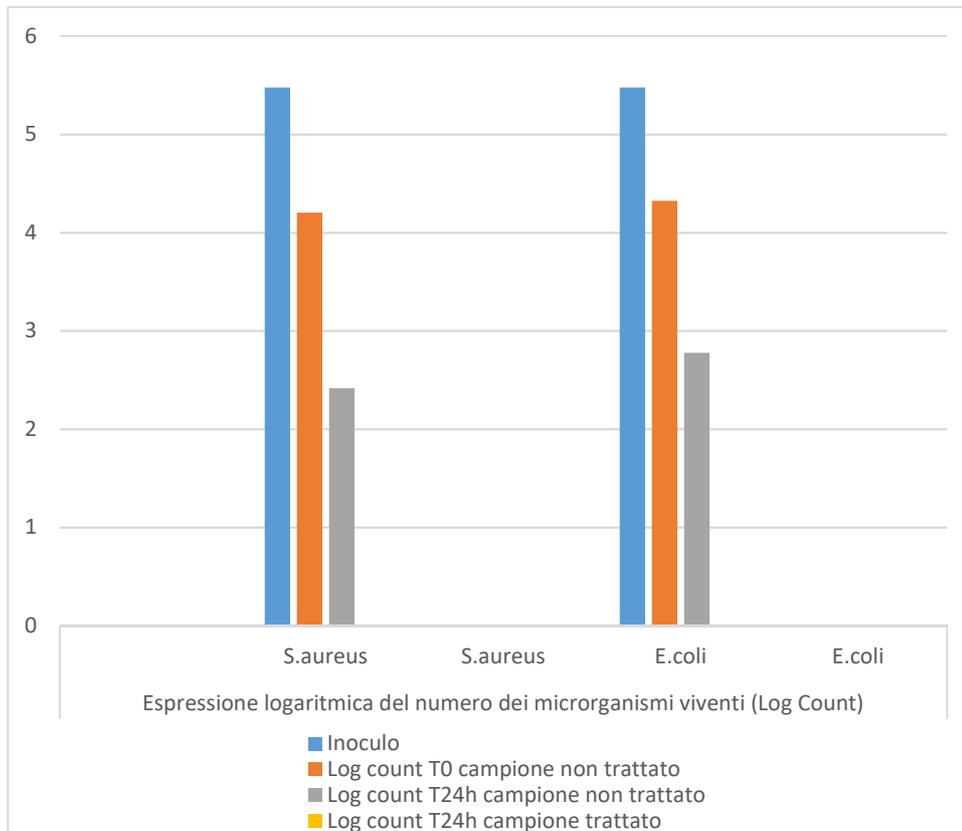
Questo documento non può essere riprodotto parzialmente salvo approvazione scritta da parte del Responsabile del Laboratorio LabAnalysis srl.
This document cannot be reproduced in part unless approved in writing by the Laboratory Manager LabAnalysis srl.

2.2 RISULTATI ESCHERICHIA COLI/RESULTS ESCHERICHIA COLI

Parametro/Parameters	Risultato/Result	
attività antibatterica/antibacterial activity (R)	3,0	
Dettagli metodo/Method details		
film di copertura/cover film		Polietilene/Polyethylene 4 cm x 4 cm
dimensione del provino/specimen size	cm ²	25
batteri vitali nell'inoculo del test/viable bacteria in the test inoculum	UFC/ml	3,00E+05
batteri vitali nel campione non trattato immediatamente dopo l'incubazione <i>viable bacteria in the untreated test sample immediately after incubation</i>	UFC/cm ²	2,10E+04
logaritmo medio dei batteri vitali nel campione non trattato immediatamente dopo l'incubazione <i>common logarithm of the viable bacteria in the untreated sample immediately after incubation</i>	-	4,32
batteri vitali nel campione non trattato dopo 24 ore di incubazione <i>viable bacteria in the untreated sample after 24 hours of incubation</i>	UFC/cm ²	900
logaritmo medio dei batteri vitali nel campione non trattato dopo 24 ore di incubazione <i>common logarithm of the viable bacteria in the untreated sample after 24 hours of incubation</i>	-	2,95
batteri vitali nel campione trattato dopo 24 ore di incubazione <i>viable bacteria in the treated sample after 24 hours of incubation</i>	UFC/cm ²	0
logaritmo medio batteri vitali nel campione trattato dopo 24 ore di incubazione <i>common logarithm of the viable bacteria in the treated test sample after 24 hours of incubation</i>	-	0,00
volume dell'inoculo utilizzato/volume inoculated used	ml	0,4



Questo documento non può essere riprodotto parzialmente salvo approvazione scritta da parte del Responsabile del Laboratorio LabAnalysis srl.
This document cannot be reproduced in part unless approved in writing by the Laboratory Manager LabAnalysis srl.



Responsabile Area Microbiologia
Ordine Nazionale dei Biologi Albo professionale n 057790
Drssa Laura Castagna

Direttore Divisione Ambientale e Alimentare
Ordine dei Chimici della Provincia di Pavia n 439 A
Dott. Guido Premoli

Questo documento non può essere riprodotto parzialmente salvo approvazione scritta da parte del Responsabile del Laboratorio LabAnalysis srl.
This document cannot be reproduced in part unless approved in writing by the Laboratory Manager LabAnalysis srl.