



**RELAZIONE TECNICA/TECHNICAL REPORT N° 22-034405\_0**

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

## 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*

<b>Microrganismi/ <i>Microrganisms</i></b>	<b>ATCC</b>
<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:*

<b>Dimensione del provino/Specimen size</b>	25 cm <sup>2</sup>
<b>Concentrazione inoculo/Inoculum concentration</b>	3,00E+5
<b>Tempo di contatto/Time contact</b>	24h
<b>Condizioni di incubazione/Incubation condition</b>	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 ( $35 \pm 1$ ) °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 ( $35 \pm 1$ ) °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 cm<sup>2</sup>;
- ✓ 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 mm<sup>2</sup>, 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 cm<sup>2</sup>;*
- *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 mm<sup>2</sup>, 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;

$L_{\text{mean}}$  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;*

*$L_{\text{mean}}$  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/cm<sup>2</sup>, recuperati dai provini non trattati dopo 24 h;
- ✓  $A_t$  è la media del logaritmo comune del numero di batteri vitali, in cellule/cm<sup>2</sup>, 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/cm<sup>2</sup>, recovered from untreated specimens after 24 h;*
- ✓  *$A_t$  is the mean of the common logarithm of the number of viable bacteria, in cells/cm<sup>2</sup>, recovered from the treated specimens after 24 h.*

## 2. RISULTATI/RESULTS

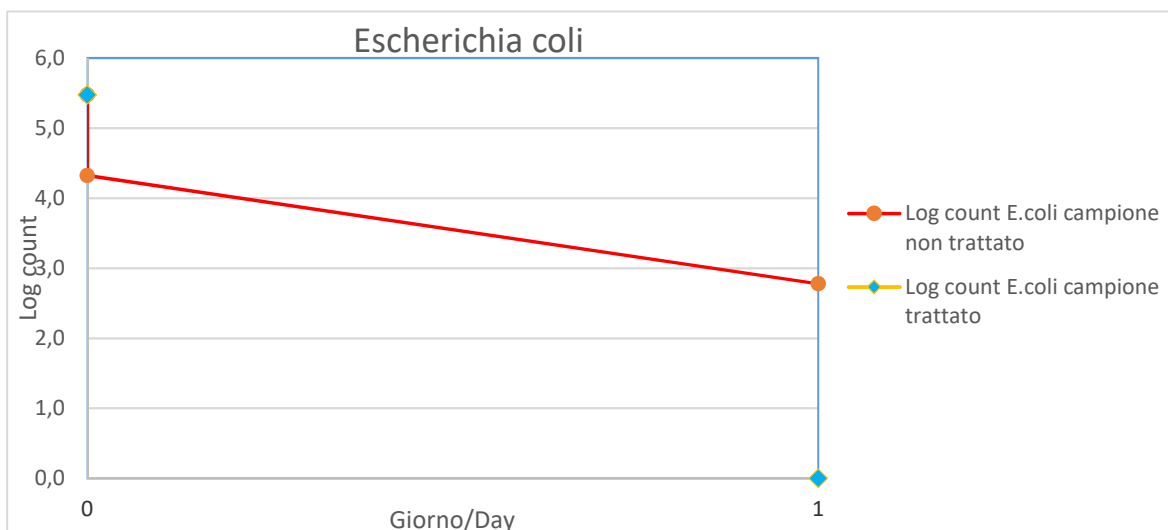
### 2.1 RISULTATI STAPHYLOCOCCUS AUREUS/RESULTS STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Parametro/Parameters	Risultato/Result	
<b>attività antibatterica/antibacterial activity (R)</b>	<b>2,4</b>	
<b>Dettagli metodo/Method details</b>		
film di copertura/cover film		Polietilene/Polyethylene 4 cm x 4 cm
dimensione del provino/specimen size	cm <sup>2</sup>	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 <sup>2</sup>	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 <sup>2</sup>	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 <sup>2</sup>	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.*

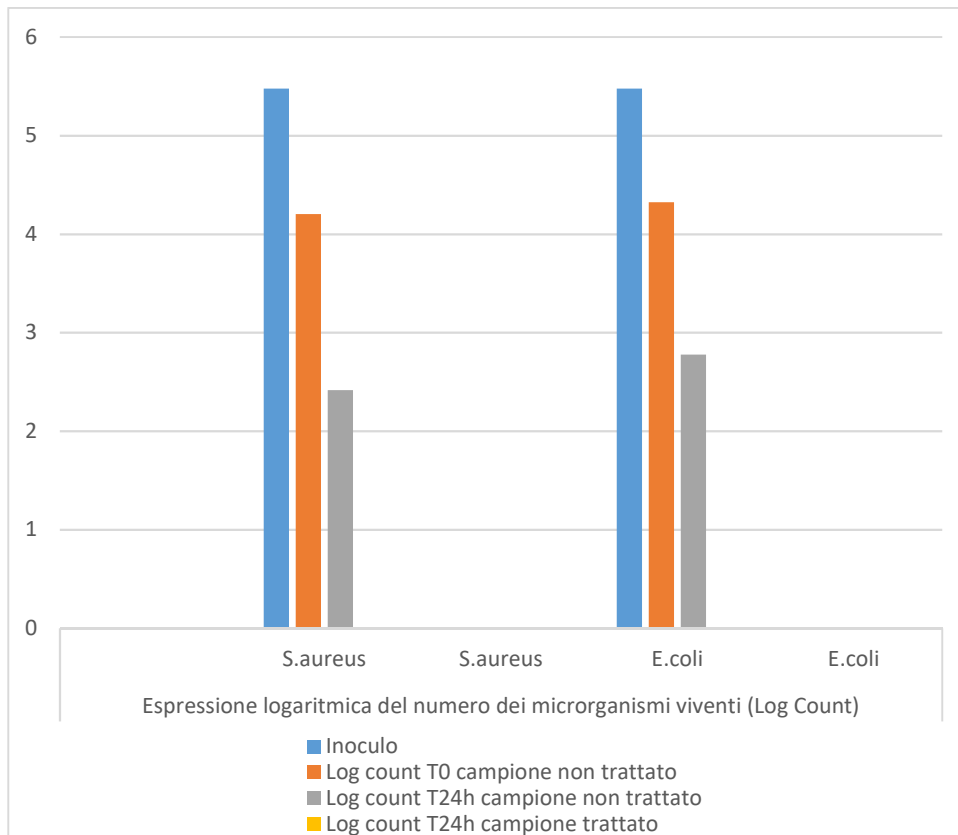
## 2.2 RISULTATI ESCHERICHIA COLI/RESULTS ESCHERICHIA COLI

Parametro/Parameters	Risultato/Result	
<b>attività antibatterica/antibacterial activity (R)</b>	<b>3,0</b>	
<b>Dettagli metodo/Method details</b>		
film di copertura/cover film		Polietilene/Polyethylene 4 cm x 4 cm
dimensione del provino/specimen size	cm <sup>2</sup>	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 <sup>2</sup>	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 <sup>2</sup>	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 <sup>2</sup>	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.*