

Relazione Tecnica n° 2004412-001

Richiedente: DIDA srl
Via Venezia, 73
35129 Padova

Tipologia campione: *Materie e Prodotti*

Analisi richiesta: *Verifica efficacia battericida in prototipo sterilizzatore per aria e gas*

Codice LabAnalysis: *2004412-001*

INDICE

1. Introduzione	pag. 3
2. Identificazione campioni	pag. 3
3. Riferimenti bibliografici	pag. 3
4. Procedura sperimentale	pag. 4
5. Conclusioni	pag. 8

1. INTRODUZIONE

In data 28-10-2020 la società DIDA srl con sede a Padova ci ha fornito un prototipo di sterilizzatore a luci LED per aria e gas su cui verificare l'efficacia battericida.

2. IDENTIFICAZIONE CAMPIONI

Campioni esaminati:

- 2004412-001 sterilizzatore con sorgente di luce a LED

3. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- UNI EN 13697:2015

4. PROCEDURA SPERIMENTALE

4.1 Esecuzione dello studio

Lo studio, eseguito presso la ditta LabAnalysis, è iniziato in data 02-11-2020 ed è terminato in data 05-11-2020.

4.1.1 identificazione microrganismi

In tabella 1 viene riportato l'elenco dei microrganismi presi in considerazione:

Microrganismi	ATCC	Lotto
Staphylococcus aureus	6538	04600504
Pseudomonas aeruginosa	9027	484-1128-4
Bacillus subtilis	6633	02900702
Escherichia coli	8739	03800906

Tabella 1

Pseudomonas aeruginosa: agente biologico di gruppo 2; microrganismo opportunisto diffuso nell'ambiente che causa occasionalmente malattie in vegetali, animali e uomo;

Staphylococcus aureus: agente biologico di gruppo 2; microrganismo ubiquitario largamente diffuso in natura e facilmente rilevabile in aria, considerato come indice di contaminazione antropica, correlato cioè alla presenza dell'uomo;

Escherichia coli: agente biologico di gruppo 2, microrganismo patogeno indicatore di contaminazione organica e/o fecale;

Bacillus subtilis: agente biologico di gruppo 2, microrganismo patogeno comunemente presente nel suolo

4.1.2 Mantenimento

Vengono utilizzate colture standard di microrganismi forniti in forma liofilizzata. I ceppi batterici (Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis ed Escherichia coli) sono stati isolati in piastre di Casein soya bean digest agar (CASO agar), dopo incubazione, alle condizioni ottimali di crescita per il ceppo considerato, sono stati conservati in frigorifero a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e hanno subito al massimo quattro passaggi nei rispettivi terreni di coltura.

4.1.3 Terreni di coltura e reagenti

- Casein soya bean digest agar (CASO agar) lotto 2972157
- Casein soya bean digest broth (CASO broth) lotto0046335
- Acqua distillata sterile

- o Diluente:
- KH_2PO_4 3.6 g
- K_2HPO_4 7.2 g
- Peptone di carne 1.0 g
- NaCl 4.3 g
- Acqua distillata 1000 ml
-

4.1.4 Principali apparecchiature

Autoclave a vapore Steristeam 2	cod.1800
Termostato Memmert: $36^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$	cod.4902
Analytical funnel GVS	lotto 7086007
Rampa di filtrazione	

4.2 Esecuzione del saggio

Poiché non esiste una norma tecnica atta a valutare l'efficacia del trattamento e non avendo a disposizione ambienti a concentrazione nota di microbi e batteri (dal momento che le concentrazioni di microbi e batteri negli ambienti sono variabili), sono stati impiegati carrier inoculati con concentrazioni note di batteri.

I carrier (supporti circolari in acciaio) di 1 cm di diametro sono stati inoculati con microrganismi patogeni presenti in concentrazione di 10^7 .

Tali carrier sono stati esposti alla sterilizzazione all'interno del prototipo con luci led e al termine della sterilizzazione sono stati rimossi e portati in laboratorio per la fase di analisi.

Si precisa che la durata del trattamento effettuato tramite il prototipo è stato di 4 cicli da 90 secondi con luci LED come da indicazioni del produttore.

Al fine di verificare che la concentrazione presente nei carrier non cambiasse, sono stati preparati carrier che hanno seguito lo stesso iter dei campioni, ma non sono stati esposti al sistema di trattamento.

Nell'elaborazione del sistema sperimentale sono state tenute come riferimento le indicazioni della norma UNI EN 13697:2015 "Disinfettanti chimici e antisettici – Prova quantitativa per superfici non porose per la valutazione dell'attività battericida e/o fungicida dei disinfettanti chimici usati in campo alimentare, industriale, domestico e istituzionale. Metodo di prova e requisiti senza azione meccanica (fase 2/stadio 2)".

I terreni di coltura e i reagenti utilizzati sono quelli riportati nella norma UNI EN 13697:2015.

-
- I ceppi batterici sono stati isolati su piastre di TSA e incubati a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ore. A partire dalle colonie sviluppatesi è stata allestita una sospensione microbica in diluente, utilizzata per il test di convalida (che è stato eseguito entro due ore dalla diluizione). E' stata misurata l'assorbanza con lo spettrofotometro (λ 625) in modo da quantificare le specie batteriche; quindi, sono state eseguite diluizioni successive fino ad ottenere una sospensione contenente 10^7 UFC/ml. (UFC: Unità Formanti Colonia).

I carrier utilizzati sono stati sterilizzati mediante immersione in alcool isopropilico, quindi fatti asciugare sotto cappa a flusso laminare.

Per ogni ceppo microbico sono stati preparati due carrier, inoculati con 50 μl di sospensione batterica alla concentrazione 10^7 , fatti asciugare sotto cappa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ per il tempo necessario all'essiccamento; uno è stato esposto al trattamento sterilizzante all'interno del prototipo e l'altro è stato utilizzato come controllo.

Quindi la macchina è stata azionata per 4 cicli da 90 secondi dopodiché i carrier sono stati trasferiti in una provetta contenente 10 ml di diluente e 5 g di microsfere in vetro.

Le provette, una volta riportate in laboratorio, sono state agitate vigorosamente al fine di staccare i microrganismi dal carrier.

Per valutare l'efficacia del sistema di trattamento è stata determinata la riduzione logaritmica del numero di microrganismi presenti sulla superficie dei carrier effettuando un confronto rispetto ai carrier di controllo non trattati, ovvero non esposti all'azione dei disinfettante.

Questo documento non può essere riprodotto parzialmente salvo approvazione scritta da parte del Responsabile del Laboratorio LabAnalysis srl.

Dopo un tempo di neutralizzazione di 5 minuti \pm 10 secondi il numero di UFC/ml della miscela è stato contato mediante diluizioni decimali seriali in diluente e semina eseguita in doppio delle diluizioni da 10^{-1} a 10^{-2} per il test e delle diluizioni da 10^{-2} a 10^{-5} per il controllo.

Dopo l'incubazione alle condizioni ottimali di crescita per ciascun microrganismo è stato registrato il numero di UFC per ciascuna diluizione che ha permesso di calcolare il numero di UFC/ml per ciascuna delle due piastre seminate (a, a').

Sono stati calcolati i valori di Nc e Nd, utilizzando la seguente equazione:

$$Nc(Nd) = \log_{10} \left[\frac{c}{n} \times \frac{10}{d} \right]$$

Nc: logaritmo del numero di UFC/carrier recuperati nel controllo con acqua

Nd: logaritmo del numero di UFC/carrier recuperati nel test

c = somma dei valori di UFC/ml della sospensione microbica in tutte le piastre considerate

n = numero di piastre prese in considerazione per calcolare c

d = fattore di diluizione delle piastre considerate per il conteggio delle colonie

10 = volume di neutralizzante

L'attività antimicrobica ME (microbicidial efficacy) è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$ME = Nc - Nd$$

4.3 Risultati

Nella tabella sottostante sono riportate le riduzioni logaritmiche e le riduzioni percentuali ottenute rispetto ai controlli non trattati.

:

microrganismi						Riduzione log	Riduzione %
	inoculo	controllo (B2)	log (B2)	campioni (B1)	log (B1)	log(B2)-log (B1)	
E.coli	2,50E+07	4,50E+05	5,65	14	1,15	4,51	99,99
S.aureus	5,60E+07	4,00E+04	4,60	9	0,95	3,65	99,98
B.subtilis	1,00E+07	2,60E+05	5,41	32	1,51	3,91	99,99
P.aeruginosa	1,60E+07	1,92E+05	5,28	2	0,30	4,98	99,99

Questo documento non può essere riprodotto parzialmente salvo approvazione scritta da parte del Responsabile del Laboratorio LabAnalysis srl.

5. CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti il sistema di trattamento in esame ha dimostrato attività battericida nei confronti dei batteri P.aeruginosa ATCC 9027, S.aureus ATCC 6538, E.coli ATCC 8739 e B.subtilis ATCC 6633 determinando una riduzione percentuale > 99.9% come da specifica del cliente.

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

Fine Relazione Tecnica



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

