



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

VALUTAZIONE EFFICACIA nei confronti di ceppi batterici e fungini

COD. LAB.: 1902081

Data Report: 20/03/2019
Revisione: 09/12/2019

Report Regressione Lineare / D-Value Method

Valutazione “*in vitro*” dell’attività antimicrobica nei confronti dei microorganismi patogeni. Test preliminari.

Prodotto / Product:

AQUASOL
acqua detergente alcalina

Committente:



Via San Mamolo, 45
40136 BOLOGNA

Data ricevimento campione / *Reception date*: 11/02/2019

Periodo di analisi: *Period of analysis*:

Data inizio analisi / *Date of testing*: 12/02/2019

Data fine analisi / *End Date test*: 15/03/2019



Metodo dell'efficacia inibente “*in vitro*” nei confronti di microorganismi patogeni.

REGRESSIONE LINEARE / D-VALUE METHOD

1-SCOPO DEL TEST / PURPOSE OF THE TEST

Il metodo della regressione lineare è un metodo rapido ed adeguato per dimostrare e per valutare l'efficacia antimicrobica di un prodotto ad attività inibente la crescita microbica.

Utilizzato come test preliminare nei confronti dei seguenti microrganismi:

Batteri Gram negativi: *Pseudomonas aeruginosa*

Batteri Gram positivi: *Stafilococcus aureus*

Muffe: *Aspergillus brasiliensis*

Il metodo si basa sulla determinazione del valore D, definito come il tempo, espresso in ore, necessario ad abbattere di 1 logaritmo (del 90% quindi) la carica microbica inoculata.

L'inoculo viene effettuato singolarmente con i più diffusi microrganismi patogeni e a tempi diversi ma molto ravvicinati, viene determinata la carica microbica residua per ogni ceppo microbico, fino a 24 ore dall'inoculo. Questi dati consentono di descrivere una curva, che permette di calcolare il valore D per ogni ceppo microbico.

Valutando tale valore in base ai criteri di accettabilità definiti per la metodica, si può dare un giudizio sull'efficacia dei conservanti del cosmetico.

2-FASI DEL TEST REGRESSIONE LINEARE

Le fasi procedurali consistono in:

- ✓ Conta microbica preliminare sui campioni da esaminare
- ✓ Preparazione dei microrganismi per l'inoculo
- ✓ Inoculo dei campioni
- ✓ Controlli ad intervalli prestabiliti della sopravvivenza dei microrganismi
- ✓ Valutazione dei risultati



3-PROCEDURA

Microrganismi utilizzati ATCC (American Type Collection Control):

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC	9027
<i>Stafilococcus aureus</i>	ATCC	652066
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC	164066

La grandezza dell'inoculo 10^6 Unità Colonia Formante (cfu)/g per i batteri.

La grandezza dell'inoculo 10^5 Unità Colonia Formante (cfu)/g per i funghi.

TERRENI DI COLTURA :

Per i batteri:

è stato utilizzato *Tryptic Soy Agar-Tween-Lecitin (TSA)*

Tempo di incubazione a temperatura di 37°C, per 5 giorni.

Per i funghi:

è stato utilizzato *Sabouraud Dextrose Agar (SDA)* addizionato di antibiotici quali la gentamicina, il cloramfenicolo e cicloeximide (inibente la crescita delle muffe).

Tempo di incubazione a temperatura di 25°C, per 5 giorni.

Neutralizzante: Letheen Broth.

Tecnica analitica: tecnica di semina in superficie in piastra Petri TSA e in piastra Petri SDA.

TEMPI DI VERIFICA

La determinazione dei microrganismi sopravvissuti viene svolta ai seguenti tempi di contatto:

tempo prima dell'inoculo (= t inoculo iniziale); dopo 30 minuti (= $T_{30 \text{ min.}}$), dopo 1 ora (= $T_{1 \text{ h}}$), dopo 2 ore (= $T_{2 \text{ h}}$), dopo 4 ore (= $T_{4 \text{ h}}$) e dopo 48 ore (= $T_{48 \text{ h}}$).

4- LIMITI DI ACCETTABILITÀ: VALORE D

Il valore D è il valore che definisce i limiti di accettabilità: tempo di inattivazione dei microrganismi contaminanti in esame.

Il valore **D** per i miceti presi in considerazione deve corrispondere a ≤ 1 ora almeno dopo 24 ore dal tempo dell'inoculo iniziale, cioè deve essere dimostrata una riduzione di almeno 1 logaritmo (pari al 90% dell'inoculo iniziale).

5-VALUTAZIONE E CALCOLO DEI RISULTATI

Nel certificato di analisi sono riportati i valori cfu (unità formanti colonia) / gr dei singoli microrganismi negli intervalli di tempo programmati.

6- BIBLIOGRAFIA

- ✓ D.S. Orth. Linear regression method for rapid determination of cosmetic preservative efficacy. *J Soc Cosmet Chem* 30: 321-332 (1979).



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

CERTIFICATO DI ANALISI *Certificate of analysis*: REGRESSIONE LINEARE: antimicrobial efficacy

Committente:



Via San Mamolo, 45
 40136 BOLOGNA

Prodotto / Product:

AQUASOL acqua detergente alcalina

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

Tempo (h)	P.aeruginosa Cfu/ml	S.aureus Cfu/ml	Asp. brasiliensis Cfu/ml
0	2,5,E+06	2,8,E+06	3,2,E+05
1	1,0,E+04	3,0,E+04	6,2,E+03
2	5,0,E+03	7,0,E+03	9,0,E+00
4	9,0,E+00	9,0,E+00	9,0,E+00
24	9,0,E+00	9,0,E+00	9,0,E+00
48	9,0,E+00	9,0,E+00	9,0,E+00

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

Tempo (h)	P.aeruginosa Cfu/ml	S.aureus Cfu/ml	Asp. brasiliensis Cfu/ml
1	99,60%	99,00%	99,81%
2	99,80%	99,75%	99,99%
4	99,9996%	99,9997%	99,9997%
24	99,9996%	99,9997%	99,9997%
48	99,9996%	99,9997%	99,9997%

Cfu / ml: Unità formanti colonia relative ad 1 ml di prodotto;
 T= intervallo di tempo di analisi.
 TVC= Total Vital Count prima dell'esecuzione del test= <10 cfu/ml.
Cfu/ ml : colony forming units relative to a milliLiter (mL) of product;
T: time of analysis.

I risultati analitici si intendono riferiti esclusivamente al campione analizzato. Il presente Documento non può essere riprodotto neppure in forma parziale salvo approvazione scritta da parte del Responsabile. Questo report è valido elettronicamente, perché costituisce copia esatta controllata e firmata del certificato di analisi originale, conservato in accordo alle procedure di Norme di Buona Prassi di Laboratorio.

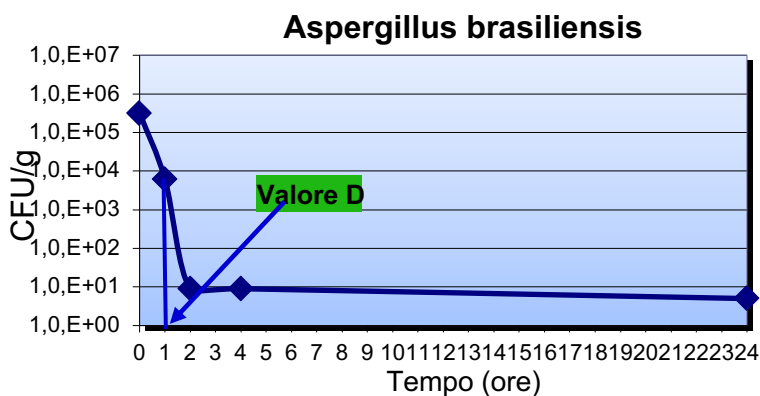
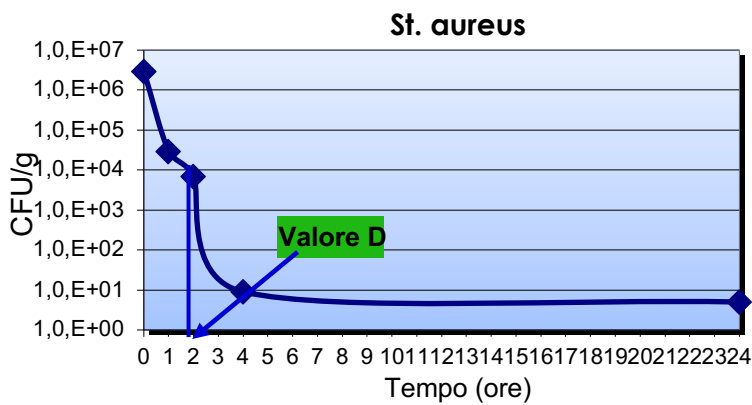
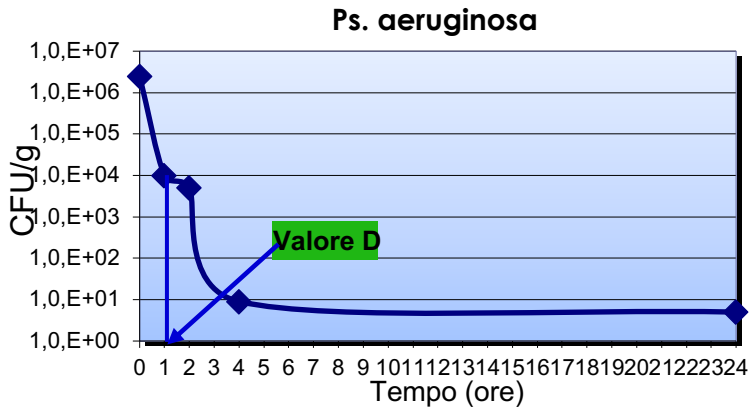
/ The results is referred only to the sample analyzed. The present certificate of analysis cannot be reproduced even in part without permission of Responsible of certificate. This report is electronically valid, because it is controlled and exact copy of the signed original of the certificate of analysis, stored procedures according to requirements of Good Laboratory Practice.



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

Total Vital Count [TVC] before the execution of the test= <10 CFU/ml

Grafici / Graphs



I risultati analitici si intendono riferiti esclusivamente al campione analizzato. Il presente Documento non può essere riprodotto neppure in forma parziale salvo approvazione scritta da parte del Responsabile. Questo report è valido elettronicamente, perché costituisce copia esatta controllata e firmata del certificato di analisi originale, conservato in accordo alle procedure di Norme di Buona Prassi di Laboratorio.

/ The results is referred only to the sample analyzed. The present certificate of analysis cannot be reproduced even in part without permission of Responsible of certificate. This report is electronically valid, because it is controlled and exact copy of the signed original of the certificate of analysis, stored procedures according to requirements of Good Laboratory Practice.



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

Tabella 3: Valore D: Microrganismi test /
Value D: Test microorganisms

	Valore D t _{24 h} <i>Value D t 24 h</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.00	Conforme
<i>Stafilococcus aureus</i>	2.00	Conforme
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1.00	Conforme

Valutando il valore del RDV si osserva che il prodotto Aquasol acqua detergente alcalina dimostra una efficacia nei confronti dei microrganismi test.

Evaluating the value of the RDV it is observed that the product Aquasol water alkaline detergent demonstrates an efficacy towards the test microorganisms.



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

Conclusioni / Conclusions

In base ai risultati ottenuti dal metodo della Regressione Lineare il valore D è conforme ai criteri di accettabilità nei confronti dei microrganismi di prova.

Per ogni batterio, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stafilococcus aureus* e per la muffa *Aspergillus brasiliensis* il coefficiente di correlazione e di determinazione sono accettabili e la correlazione ottenuta dalla regressione lineare risulta significativa (come rilevano i valori riportati in tabella 3).

È possibile concludere che la valutazione “*in vitro*” dell’attività inibente nei confronti dei batteri appartenenti ai ceppi *Pseudomonas* e *Stafilococcus*, e alle muffe *Aspergillus* del prodotto di prova denominato:



Via San Mamolo, 45
40136 BOLOGNA

AQUASOL acqua detergente alcalina

presenta una efficacia antibatterica e antifungina “*in vitro*” nei confronti dei microorganismi patogeni di prova, batteri *Pseudomonas aeruginosa* e *Stafilococcus aureus* e muffa *Aspergillus brasiliensis*.

Redazione certificato di analisi: / Date report date 20/03/2019

(Firma / Signature Alberta Dr.ssa Vandini
n. AA_039993 Albo Biologi Docente a contratto Microbiologia
cosmetica Master II in Scienze e Tecnologia cosmetica –
Università degli Studi di Ferrara)

in collaborazione Prof P. G. Balboni (Firma / Signature
Prof. cultore della materia “Microbiologia”
presso l’Università degli Studi di Ferrara)