

## **DETERMINAZIONE DELL' ATTIVITA' ANTIBATTERICA**

### **EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY**

<b>COMMITTENTE / CUSTOMER</b>	<b>CoLibri System S.p.A. Via Ripamonti 44 20141 Milano (MI) - Italy</b>
<b>SPONSOR</b>	<b>CoLibri System S.p.A. Via Ripamonti 44 20141 Milano (MI)</b>
<b>CAMPIONE / SAMPLE</b>	<b>Copertine Buste Colibri Shield rosso trattato Lotto/Batch: n.p.</b>
<b>DATA REPORT / REPORT DATE</b>	<b>13/11/2020</b>
<b>REPORT N°</b>	<b>REL/3959/2020/AAT/ELB</b>

**Sede legale  
e laboratori**

Via Quarantadue Martiri 213/B 28924  
**Verbania (VB), Italia**

Tel. +39 0323 586239  
Fax +39 0323 496877  
[info@abich.it](mailto:info@abich.it)

CF/VAT/Reg. Imp.  
VCO: 01864020035  
R.E.A: 189901  
Cap. Soc. € 116.000 i.v.

**Centro Studi Clinici  
e Cosmetologici**

Via Della Burrone 51, 20055  
**Vimodrone (MI), Italia**

[www.abich.it](http://www.abich.it)

## Indice / Table of contents

<b>1</b>	<b>PARTE PRIMA / PART ONE</b>	<b>INFORMAZIONI GENERALI / GENERAL INFORMATION ...</b>	<b>3</b>
1.1	COMMITTENTE / CUSTOMER .....		3
1.2	SPONSOR.....		3
1.3	CAMPIONE ANALIZZATO / TESTED SAMPLE.....		3
1.4	CONTROLLO / CONTROL .....		3
1.5	TEST / ASSAY.....		3
1.6	LABORATORIO INCARICATO / ENTRUSTED LABORATORY.....		4
1.7	DATE DELLO STUDIO / STUDY DATES .....		4
1.8	RICERCATORE PRINCIPALE / MAIN INVESTIGATOR .....		4
1.9	DIRETTORE DELLO STUDIO / STUDY DIRECTOR .....		4
1.10	RESPONSABILE ASSICURAZIONE QUALITÀ / QUALITY ASSURANCE MANAGER.....		4
<b>2</b>	<b>PARTE SECONDA / PART TWO</b>	<b>PROTOCOLLO SPERIMENTALE / STUDY DESIGN .....</b>	<b>5</b>
2.1	SCOPO DEL TEST / PURPOSE OF THE TEST .....		5
2.2	CEPPI UTILIZZATI E METODICA / USED STRAINS AND METHOD .....		5
2.3	VALUTAZIONE DEI RISULTATI / EVALUATION OF RESULTS .....		7
<b>3</b>	<b>PARTE TERZA / PART THREE</b>	<b>RISULTATI E CONCLUSIONI / RESULTS AND</b>	
	<b>CONCLUSIONS</b>	<b>8</b>	
3.1	RISULTATI / RESULTS .....		8
3.2	CONCLUSIONI / CONCLUSIONS .....		11
<b>4</b>	<b>PARTE QUARTA / PART FOUR</b>	<b>RIFERIMENTI / REFERENCES .....</b>	<b>12</b>

### Nota/Note:

Il risultato dei test citati nel presente rapporto si riferisce esclusivamente al/ai prodotto/i testato/i e alle particolari condizioni sperimentali impiegate nel test. Il presente rapporto non può essere riprodotto parzialmente senza il consenso preliminare scritto degli sperimentatori.

The results of the test in this report refer only to the tested product/s and to the particular experimental conditions here employed. This report cannot be partially duplicated without the preliminary written approval of the experimenters.

# 1 **PARTE PRIMA / PART ONE** **INFORMAZIONI GENERALI / GENERAL INFORMATION**

## 1.1 **Committente / Customer**

CoLibri System S.p.A.  
Via Ripamonti 44  
20141 Milano (MI) - Italy

## 1.2 **Sponsor**

CoLibri System S.p.A.  
Via Ripamonti 44  
20141 Milano (MI)

## 1.3 **Campione analizzato / Tested sample**

<b>Campione Sample</b>	<b>Codice interno Internal Code</b>	<b>Descrizione Description</b>
Copertine Buste Colibri Shield rosso trattato Lotto: n.p.	4719/20-02	Foglio trasparente in polietilene /polyethylene trasparente layer

## 1.4 **Controllo / Control**

<b>Controllo/Control</b>	<b>Fornitore / Supplier</b>	<b>Descrizione Description</b>
Copertine Buste Colibri verde senza trattamento antimicrobico / Support without antimicrobial treatment**	**controllo fornito dal committente / control supplied by the customer	Foglio trasparente in polietilene / polyethylene trasparente layer plastica in polietilene

## 1.5 **Test / Assay**

Test di determinazione dell'attività antibatterica. Come norma di riferimento per il protocollo di test è stata utilizzata la norma ISO 22196:2011.

Test for determining the antibacterial activity. The ISO 22196: 2011 standard was used as the reference standard for the test protocol.

**1.6 Laboratorio incaricato / Entrusted laboratory**

ABICH S.r.l. - Via 42 Martiri 213/B – 28924  
Verbania - tel +39 (0)323 586239 fax +39 (0)323 496877

**1.7 Date dello studio / Study dates**

Inizio / Start: 10/11/2020  
Fine / End: 13/11/2020

**1.8 Ricercatore principale / Main investigator**

Dott.ssa Clara Sinigaglia - Tecnico di Laboratorio  
Biomedico / Biomedical Laboratory Technician  
ABICH S.r.l.

**1.9 Direttore dello studio / Study Director**

Dr.ssa Elena Bocchietto, Biologa specialista in  
Biotecnologie / Biology, Biotechnology Specialist  
ABICH S.r.l.

**1.10 Responsabile assicurazione qualità / Quality assurance manager**

Dr. Emanuele Caravati, PhD  
ABICH S.r.l.

## 2 PARTE SECONDA / PART TWO PROTOCOLLO SPERIMENTALE / STUDY DESIGN

### 2.1 *Scopo del test / Purpose of the test*

Scopo del test è determinare l'attività antimicrobica di trattamenti di superfici di varia natura secondo la metodica descritta nella norma ISO 22196:2011, applicabile a prodotti tessili, prodotti in plastica, in metallo e in ceramica. Tuttavia non si utilizzano i criteri della norma nella valutazione dei risultati in quanto lo scopo non è validare un trattamento disinfettante, ma si fornisce solo una percentuale di abbattimento della carica microbica.

*The purpose of the test is to evaluate antimicrobial activity on bacteria on the surface of antimicrobial products according to the method described in ISO 22196:2011. The method is suitable for textiles and plastic, metal and ceramic products.*

*However, the criteria of the standard are not used in the evaluation of the results because the purpose of the test is not able to validate a disinfectant treatment, but it shows only a percentage of microbial reduction.*

### 2.2 *Ceppi utilizzati e metodica / Used strains and method*

Il campione è giunto in laboratorio in condizioni non sterili, in un sacchetto di carta non ermetico; è stato conservato a temperatura ambiente e successivamente maneggiato con guanti monouso sterili. Prima dell'analisi il campione è stato pulito con tamponi imbevuti di etanolo, come descritto nella norma al punto 5.2.6 d). Tutte le operazioni sono state condotte in sterilità sotto cappa a flusso laminare di classe II.

Oltre al campione è stato analizzato un supporto di controllo senza trattamento antimicrobico, fornito dal committente.

*The sample comes to the laboratory in non-sterile conditions, in a non-hermetic package; it has been stored at room temperature and subsequently handled with sterile mono-use gloves. Sample surface has been cleaned with absorbent cotton immersed in ethanol, as described in paragraph 5.2.6 d) of the standard. All the operations were conducted in sterile conditions, using a safety cabinet.*

La determinazione dell'attività antimicrobica è stata eseguita verso due ceppi batterici:

*Antimicrobial activity was evaluated against two bacterial strains:*

<b>CEPPO STRAIN</b>	<b>Terreno di crescita Growth Medium</b>	<b>Concentrazione inoculo Inoculum concentration (CFU/ml)</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Nutrient broth e agar	4,0 x 10 <sup>5</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Nutrient broth e agar	8,0 x 10 <sup>5</sup>

I ceppi sono stati conservati come descritto nella norma al punto 5.2.5. Per la preparazione dell'inoculo i ceppi di microrganismi sono stati passati in slant di agar più volte come descritto al punto 5.2.6.a) e quindi diluiti per ottenere una concentrazione finale della sospensione batterica di circa  $2,5 \times 10^5$ -  $1,0 \times 10^6$  per ciascun microrganismo testato.

I campioni sono stati posti in piastre petri sterili. 400  $\mu$ l di sospensione batterica sono stati applicati sulla superficie (50 x 50 mm) di ogni campione e dei controlli. Sopra l'inoculo è stato applicato uno strato di polietilene di 50 x 50 mm, per rendere uniforme il contatto sulla porzione di superficie da analizzare.

Sono stati inoculati 3 campioni trattati e 6 campioni non trattati di controllo; 3 dei campioni non trattati sono stati analizzati immediatamente dopo l'inoculo, utilizzando 10ml di SCDLP Broth (vedi punto 5,2,4 e) della norma) per sciacquare via l'inoculo.

I restanti 6 campioni, 3 trattati e 3 non trattati, sono stati posti in piastre petri contenenti 1 ml di acqua sterile, non a contatto con la superficie inocolata, in modo da ottenere un ambiente con elevata percentuale di umidità (>90%) incubate a  $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  per  $24 \pm 1$ h. Dopo il periodo di incubazione i campioni sono stati analizzati, risciacquando la superficie inocolata con 10 ml di SCDLP Broth.

La conta dei microrganismi vitali è stata effettuata come descritto al punto 5.2.6 h) della norma, prelevando 1 ml del liquido di risciacquo e diluendolo in soluzione fisiologica in tampone fosfato (punto 5.2.4 g della norma) con una serie di diluizioni scalari 1:10 fino a  $1 \times 10^5$  volte. Le semine finali sono state effettuate per inclusione in piastra in Plate Count Agar. Le piastre sono state incubate a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  per 45h.

Sono state considerate per la conta solo le piastre contenenti da 30 a 300 colonie. I campioni per cui non si è riscontrata crescita in nessuna piastra sono stati considerati come "<1". La conta è stata poi corretta per il fattore di diluizione.

Ogni piastra è stata seminata in doppio.

*Bacterial strains were stored as described in paragraph 5.2.5 of the standard. For the preparation of the inoculum, bacterial strains were transferred on slants several times as described in the method (par. 5.2.6.a)) and then diluted in order to obtain a bacterial suspension of  $2.5 \times 10^5$ -  $1.0 \times 10^6$  cells/ml for each tested strain.*

*Each test piece (50x50mm) was placed in a sterile Petri dish. 400  $\mu$ l of bacterial suspension was applied on the surface of each test piece of sample and control. The tested pieces were covered with a polyethylene film of 50x50mm to spread the inoculum on all the surface to be tested.*

*3 antimicrobial test pieces and 6 untreated pieces were inoculated. 3 untreated pieces were analyzed immediately after inoculation, by washing the surface with 10ml of SCDLP Broth (see par. 5,2,4 e) of the standard).*

*The remaining 6 samples, 3 antimicrobial test pieces and 3 untreated pieces, were placed into Petri dishes with 1 ml of sterile water, which is maintained not in contact with the samples, in order to obtain a humidified chamber with high percentage of humidity (>90%), and incubated  $24 \pm 1$ h at  $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . After the incubation time samples were analyzed by washing the surface with 10ml of SCDLP Broth.*

*The microbial count was carried out as described in par 5.2.6 h9 of the standard., taking 1 ml of the washing liquid and diluting it 1:10 in physiologic solution up to  $1 \times 10^5$  times. Plate counts were carried out with the inclusion method on Plate Count Agar plates. Plates were incubated 45h at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .*

*For the enumeration only plates with 30-300 CFU were considered. Samples that showed no bacterial growth were considered as "<1". Values obtained were then corrected for the dilution factor. Each sample was plated in duplicate.*

## 2.3 Valutazione dei risultati / Evaluation of results

Per calcolare l'abbattimento logaritmico viene utilizzata la seguente formula / *the logarithmic reduction is calculated as follows:*

$$R = [\log (B/A) - \log (C/A)]$$

Dove / *where:*

- R:** abbattimento logaritmico / *logarithmic reduction*  
**A:** media del numero di cellule vitali immediatamente dopo l'inoculo su campioni non trattati / *average of the number of the viable cells of bacteria immediately after inoculation*  
**B:** media del numero di cellule vitali dopo 24h su campioni non trattati / *average of the number of the viable cells of bacteria on the untreated test piece after 24h*  
**C:** media del numero di cellule vitali dopo 24h su campioni trattati / *average of the number of the viable cells of bacteria on the antimicrobial test piece after 24h*

L'efficacia antimicrobica del trattamento viene valutata in base all'abbattimento logaritmico R = valore dell'attività antimicrobica. /

*Antimicrobial activity is evaluated according to the logarithmic reduction R= value of antimicrobial activity.*

Il test viene ritenuto valido quando sono soddisfatte le seguenti condizioni / *Test is considered valid when the following conditions are satisfied:*

- 1) il rapporto tra la differenza tra il massimo ( $A_{Max}$ ) e il minimo ( $A_{Min}$ ) logaritmo del numero di batteri vitali dei campioni non trattati subito dopo l'inoculo e il logaritmo medio del numero di batteri vitali nelle tre repliche nei campioni non trattati subito dopo l'inoculo è  $<0,2$

*the ratio between the maximum ( $A_{Max}$ ) and the minimum ( $A_{Min}$ ) logarithm of the number of viable bacteria of the untreated sample immediately after the inoculation and the mean average of the logarithm of the number of viable bacteria in the 3 test pieces (untreated) is  $<0,2$*

$$[(\log A_{Max} - \log A_{Min}) / \log (A)] < 0,2$$

- 2) il numero medio di batteri vitali immediatamente dopo l'inoculo di un campione non trattato è nel range 1,0 -  $4,0 \times 10^5$  cellule

*the average of the number of viable bacteria immediately after inoculation on an untreated test piece shall be within the range 1,0 -  $4,0 \times 10^5$  cells*

- 3) il numero di batteri vitali ottenuti dal campione non trattato dopo 24 h deve essere  $\geq 1 \times 10^3$  cellule su tutte le tre repliche

*the number of viable bacteria on an untreated test piece after 24h shall not be less than  $1 \times 10^3$  cells on all three test pieces*

**Il trattamento antimicrobico del campione viene ritenuto efficace quando:**

***The antimicrobial treatment of the sample is considered effective when:***

$$R \geq 2$$

### 3 PARTE TERZA / PART THREE RISULTATI E CONCLUSIONI / RESULTS AND CONCLUSIONS

#### 3.1 Risultati / Results

Ceppo Strain		T0 non trattato / untreated (CFU)	T24h non trattato / untreated (CFU)	T24h trattato / treated (CFU)
<i>Escherichia coli</i>	Repl. 1	5,1 X 10 <sup>3</sup>	80	<10
	Repl. 2	6,0 X 10 <sup>3</sup>	70	<10
	Repl. 3	7,3 X 10 <sup>3</sup>	70	<10
<i>Staphylococcus aureus</i>	Repl. 1	1,7 X 10 <sup>4</sup>	<10	<10
	Repl. 2	1,8 X 10 <sup>4</sup>	<10	<10
	Repl. 3	1,8 X 10 <sup>4</sup>	<10	<10

Ceppo Strain		T4 non trattato / untreated (CFU)	T4h trattato / treated (CFU)
<i>Escherichia coli</i>	Repl. 1	3,7 X 10 <sup>3</sup>	1,8 X 10 <sup>3</sup>
	Repl. 2	4,4 X 10 <sup>3</sup>	2,5 X 10 <sup>3</sup>
	Repl. 3	3,1 X 10 <sup>3</sup>	4,2 X 10 <sup>3</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Repl. 1	3,2 X 10 <sup>3</sup>	6,6 X 10 <sup>3</sup>
	Repl. 2	6,3 X 10 <sup>3</sup>	1,3 X 10 <sup>3</sup>
	Repl. 3	6,6 X 10 <sup>3</sup>	7,2 X 10 <sup>3</sup>

Ceppo Strain		T8 non trattato / untreated (CFU)	T8h trattato / treated (CFU)
<i>Escherichia coli</i>	Repl. 1	3,2 X 10 <sup>3</sup>	1,0 X 10 <sup>3</sup>
	Repl. 2	3,2 X 10 <sup>3</sup>	1,3 X 10 <sup>3</sup>
	Repl. 3	2,9 X 10 <sup>3</sup>	3,3 X 10 <sup>3</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Repl. 1	4,1 X 10 <sup>3</sup>	4,0 X 10 <sup>2</sup>
	Repl. 2	3,1 X 10 <sup>3</sup>	1,0 X 10 <sup>2</sup>
	Repl. 3	2,3 X 10 <sup>3</sup>	7,0 X 10 <sup>2</sup>

[(log A <sub>Max</sub> - log A <sub>Min</sub> ) / log (A)] < 0,2	<i>Escherichia coli</i>	<b>0,02</b>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>0,01</b>



Ceppo Strain	(A) Media T0 non trattato / Average T0 untreated	(B) Media T4h non trattato / Average T4 untreated	(C) Media T4h trattato / Average T4 treated	Abbattimento log Log reduction  (R)
<i>Escherichia coli</i>	6,1 x 10 <sup>3</sup> CFU	3,7 x 10 <sup>3</sup> CFU	2,8 x 10 <sup>3</sup> CFU	<b>0,12</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,8 x 10 <sup>4</sup> CFU	5,3 x 10 <sup>3</sup> CFU	5,0 x 10 <sup>3</sup> CFU	<b>0,03</b>

Ceppo Strain	(A) Media T0 non trattato / Average T0 untreated	(B) Media T8h non trattato / Average T8 untreated	(C) Media T8h trattato / Average T8 treated	Abbattimento log Log reduction  (R)
<i>Escherichia coli</i>	6,1 x 10 <sup>3</sup> CFU	3,1 x 10 <sup>3</sup> CFU	1,9 x 10 <sup>3</sup> CFU	<b>0,22</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,8 x 10 <sup>4</sup> CFU	3,1 x 10 <sup>3</sup> CFU	4,0 x 10 <sup>2</sup> CFU	<b>0,90</b>

Dopo 8 ore il campione trattato mostra un abbattimento del 90% rispetto al controllo non trattato nei confronti di *S.aureus* e un abbattimento del 22% rispetto al non trattato nei confronti di *E.coli*. Questo abbattimento non è sufficiente per qualificare il trattamento come disinfettante (che richiede un abbattimento > del 99,9%), ma è un indice oggettivo di maggiore proprietà antimicrobica delle copertine trattate rispetto a quelle non trattate.

*After 8 hours the treated sample shows a reduction of 90% compared to the untreated control against S. aureus and a reduction of 22% compared to the untreated control against E. coli.*

*This reduction is not sufficient to qualify the treatment as a disinfectant (which requires a reduction of > 99.9%), but it is an objective index of a better antimicrobial properties of the treated covers compared to the untreated ones.*

Ceppo Strain	(A) Media T0 non trattato / Average T0 untreated	(B) Media T24h non trattato / Average T24 untreated	(C) Media T24h trattato / Average T24 treated	Abbattimento log Log reduction  (R)
<i>Escherichia coli</i>	6,1 x 10 <sup>3</sup> CFU	73	<10	<b>0,87</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,8 x 10 <sup>4</sup> CFU	<10	<10	<b>0</b>

Dopo 24 ore il campione trattato mostra un abbattimento dell'87% rispetto al controllo non trattato nei confronti di *E.coli*. Questo abbattimento non è sufficiente per qualificare il trattamento come disinfettante (che richiede un abbattimento > del 99,9%), ma è un indice oggettivo di maggiore proprietà antimicrobica delle copertine trattate rispetto a quelle non trattate per *E. coli*.

Per *S. aureus* a 24 h l'abbattimento della carica microbica è al 100% sia per il campione trattato che per quello non trattato, quindi non evidenzia un vantaggio del trattamento trascorse le 24 h, per questo ceppo microbico

*After 24 hours, the treated sample shows an 87% reduction compared to the untreated control against E.coli.*

*This reduction is not sufficient to qualify the treatment as a disinfectant (which requires a > 99.9% reduction), but it is an objective index of better antimicrobial properties of the treated covers compared to the untreated ones against E. coli.*

*S. aureus after 24 h treatment, the reduction of the microbial load is 100% for both treated and the untreated sample, therefore it does not show an advantage of the treatment after 24 h, for this microbial strain.*

### 3.2 Conclusioni / Conclusions

Sulla base dei risultati sopra riportati il trattamento antimicrobico effettuato sul campione: / on the bases of the results above reported, the antimicrobial treatment on the sample:

#### **Copertine Buste Colibrì Shield rosso trattato**

**Lotto / Batch: n.p.**

mostra un abbattimento della carica microbica del 90% nei confronti di *S.aureus* dopo 8 ore e dell'87% nei confronti di *E.coli* dopo 24 ore di trattamento

*shows a microbial reduction of 90% against S.aureus after 8 hours and shows a microbial reduction of 87% against E.coli after 24 hours treatment.*

Data/Date: 13/11/2020

Direttore dello studio  
*Study Director*  
Dott.ssa Elena Bocchietto  
Documento con firma digitale

**Sede legale  
e laboratori**

Via Quarantadue Martiri 213/B 28924  
**Verbania (VB), Italia**

Tel. +39 0323 586239  
Fax +39 0323 496877  
[info@abich.it](mailto:info@abich.it)

CF/VAT/Reg. Imp.  
VCO: 01864020035  
R.E.A: 189901  
Cap. Soc. € 116.000 i.v.

**Centro Studi Clinici  
e Cosmetologici**

Via Della Burrone 51, 20055  
**Vimodrone (MI), Italia**

[www.abich.it](http://www.abich.it)

## 4 **PARTE QUARTA / PART FOUR** **RIFERIMENTI / REFERENCES**

ISO 22196:2011 – Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces

### **Sede legale e laboratori**

Via Quarantadue Martiri 213/B 28924  
**Verbania (VB), Italia**

Tel. +39 0323 586239  
Fax +39 0323 496877  
[info@abich.it](mailto:info@abich.it)

CF/VAT/Reg. Imp.  
VCO: 01864020035  
R.E.A: 189901  
Cap. Soc. € 116.000 i.v.

### **Centro Studi Clinici e Cosmetologici**

Via Della Burrone 51, 20055  
**Vimodrone (MI), Italia**

[www.abich.it](http://www.abich.it)