

Convalida del metodo per la valutazione della pulizia microbica di maschere ad uso medico secondo la norma UNI EN ISO 11737-1: 2018

Validation of the method for the evaluation of microbial cleanliness for medical masks based on UNI EN ISO 11737-1: 2018

COMMITTENTE / CUSTOMER	PASINI PIER MAURIZIO SRL Via Flavio Torti, n. 5 15053 CASTELNUOVO SCRIVIA (AL) - Italy
SPONSOR	PASINI PIER MAURIZIO SRL Via Flavio Torti, n. 5 15053 CASTELNUOVO SCRIVIA (AL)
CAMPIONE / SAMPLE	Mascherine riutilizzabili Holly by Pasini - sanitizzata con amuchina Lotto/Batch: n.p. Codice interno/Internal code: 1229/20-03
DATA RAPPORTO / REPORT DATE	14/05/2020
REPORT N°.	REL/1359/2020/MIC/ELB

Sede legale
e laboratoriVia Quarantadue Martiri 213/B 28924
Verbania (VB), ItaliaTel. +39 0323 586239
Fax +39 0323 496877
info@abich.itCF/VAT/Reg. Imp.
VCO: 01864020035
R.E.A: 189901
Cap. Soc. € 116.000 i.v.Centro Studi Clinici
e CosmetologiciVia Della Burrone 51, 20090
Vimodrone (MI), Italiawww.abich.it

Indice / Table of contents

1. PARTE PRIMA / PART ONE INFORMAZIONI GENERALI / GENERAL INFORMATION.....	3
1.1 COMMITTENTE / CUSTOMER.....	3
1.2 SPONSOR	3
1.3 CAMPIONE ANALIZZATO / TESTED SAMPLE	3
1.4 TEST / ASSAY	4
1.5 LABORATORIO INCARICATO / ENTRUSTED LABORATORY.....	4
1.6 DATE DELLO STUDIO / STUDY DATES	4
1.7 RICERCATORE PRINCIPALE / MAIN INVESTIGATOR	4
1.8 DIRETTORE DELLO STUDIO / STUDY DIRECTOR	4
1.9 RESPONSABILE ASSICURAZIONE QUALITÀ / QUALITY ASSURANCE MANAGER.....	4
2. PARTE SECONDA / PART TWO PROTOCOLLO SPERIMENTALE / STUDY DESIGN	5
2.1 SCOPO DEL TEST / PURPOSE OF THE TEST.....	5
2.2 NORME DI RIFERIMENTO / REFERENCE STANDARDS	5
2.3 MATERIALI E PROTOCOLLO D'ANALISI / MATERIALS AND TESTING PROTOCOL	5
3. PART THREE /PARTE TERZA RISULTATI E CONCLUSIONI / RESULTS AND CONCLUSIONS	9
3.1 RISULTATI / RESULTS.....	9
3.2 CONCLUSIONI / CONCLUSIONS.....	10
4. PARTE QUARTA / PART FOUR RIFERIMENTI / REFERENCES.....	11

Nota/Note:

I risultati del test presentati in questo report sono esclusivamente riferiti al prodotto testato ed alle specifiche condizioni sperimentali impiegate. Questo report o parti di esso possono essere duplicati esclusivamente previo consenso scritto da parte del personale di ricerca coinvolto.

The results of the test in this report is only related to the tested product/s and to the specific experimental conditions here employed. This report or parts of it cannot be duplicated without a preliminary written approval by the research staff..

Sede legale e laboratori

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

Tel. +39 0323 586239
Fax +39 0323 496877
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, 20090
Vimodrone (MI), Italia

www.abich.it

1. PARTE PRIMA / PART ONE INFORMAZIONI GENERALI / GENERAL INFORMATION

1.1 Committente / Customer

PASINI PIER MAURIZIO SRL
Via Flavio Torti, n. 5
15053 CASTELNUOVO SCRIVIA (AL) - Italy

1.2 Sponsor

PASINI PIER MAURIZIO SRL
Via Flavio Torti, n. 5
15053 CASTELNUOVO SCRIVIA (AL)

1.3 Campione analizzato / Tested sample

Campione Sample	Codice interno Internal Code	Descrizione Description
Mascherine riutilizzabili Holly by Pasini - sanitizzata con amuchina Batch: n.p.	1229/20-03	mascherine / masks



Sede legale
e laboratori

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

Tel. +39 0323 586239
Fax +39 0323 496877
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, 20090
Vimodrone (MI), Italia

www.abich.it

1.4 Test / Assay

Convalida del metodo per la valutazione della pulizia microbica o contaminazione microbica di maschere medicali.

Validation of the method for the evaluation of microbial cleanliness or bioburden for medical masks.

1.5 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 - Italy

1.6 Date dello Studio / Study Dates

Inizio / Start: 08/05/2020

Fine / End: 11/05/2020

1.7 Ricercatore principale / Main investigator

Dr.ssa Elena Limioli
Chimico e tecnologo farmaceutico / Chemical and
Pharmaceutical technologist
ABICH S.r.l.

1.8 Direttore dello studio / Study Director

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

1.9 Responsabile assicurazione Qualità / Quality assurance manager

Dott. Emanuele Caravati, Dottore di ricerca in
Ecologia/Ph.D. in Ecology
ABICH S.r.l.

2. PARTE SECONDA / PART TWO **PROTOCOLLO SPERIMENTALE / STUDY DESIGN**

2.1 Scopo del test / Purpose of the test

Il presente studio si propone di validare il metodo utilizzato per valutare la pulizia microbica di maschere per uso medico allo scopo di valutare la loro idoneità all'uso. Lo scopo della convalida è quello di dimostrare:

- l'adeguatezza del metodo applicato nel rimuovere i contaminanti presenti sul prodotto (efficacia di recupero)
- l'assenza di interferenze da parte del prodotto e/o liquido di estrazione utilizzato nel metodo di analisi.

The present study is designed to validate the method used to evaluate the microbial cleanliness of medical masks. The aim is to evaluate their performances for their intended use. The purpose of the validation is to demonstrate:

- The adequacy of the method for the removal of microorganisms from a product (recovery efficiency)
- The absence of interferences from the product and/or extraction liquid used in the testing method.

2.2 Norme di riferimento / Reference standards

Le norme di riferimento impiegate sono:

UNI EN ISO 11737-1: 2018 – Sterilizzazione dei dispositivi medici – Metodi microbiologici – Parte 1: determinazione di una popolazione di microorganismi sui prodotti –
UNI EN ISO 14683:2019- Maschere facciali ad uso medico.

The references are the standards:

UNI EN ISO 11737-1: 2018 – Sterilization of health care products – Microbiological methods – Part 1: determination of a population of microorganisms on products
UNI EN 14683:2019– Medical face masks – Requirements and test methods.

2.3 Materiali e protocollo d'analisi / Materials and testing protocol

Campionamento/Sampling

La convalida del metodo per la valutazione della pulizia microbica è effettuata su un numero minimo di 3 maschere. Le maschere prima dell'analisi sono state sottoposte al seguente

trattamento di lavaggio: immersione in Amuchina allo 0.2% per 15 minuti, risciacquo con acqua distillata e immersione in acqua distillata (x 2 volte); fase di asciugamento sotto cappa a flusso laminare.

The validation of the microbial cleanliness is performed at least on three (3) masks. Before testing the masks were treated with the following washing process: immersion of 15 minutes in Amukine 0.2%; rinse with deionized water and immersion in deionized water (two times); dried under laminar flow bench.

Procedura di test/Testing procedure

A) Verifica dell'efficacia di recupero del metodo di valutazione della pulizia microbica / Evaluation of bioburden method recovery efficiency

Ogni maschera viene estratta con 300 ml di liquido di estrazione (1 g/l di peptone, 5 g/l di NaCl e 2 g/l di Tween 20) all'interno di un contenitore sterile posto ad agitare per 5 minuti su oscillatore orbitale, 250 rpm. Prima dell'immersione viene verificato il peso della maschera. Dopo questa fase di estrazione, sotto cappa a flusso laminare 100 ml del liquido di estrazione sono filtrati attraverso un filtro da 0,45 μ m ed il filtro posto su una piastra di TSA (Tryptic Soy Agar) per la conta microbica totale di aerobi. Questa estrazione è ripetuta per più volte fino ad ottenere una riduzione del numero dei microorganismi recuperati. Le piastre di TSA sono incubate per 3 giorni a 30-35 °C. Come controllo negativo 100 ml di liquido di estrazione sono filtrati nello stesso modo ed il filtro posto su piastra agarizzata di TSA.

The full mask is extracted by 300 ml of extraction liquid (1 g/l Peptone, 5 g/l NaCl and 2 g/l of Tween 20) in a sterile container laid down on an orbital shaker for 5 minutes, 250 rpm. Each mask is weighted prior testing. The bottle is laid down on an orbital shaker and shaken for 5 min. After this extraction step, under a laminar flow bench 100 ml of the extraction liquid is filtered through a 0,45 μ m filter and laid down on a TSA (Tryptic Soy agar) plate for the total viable aerobic microbial count. The TSA plates are incubated for 3 days at 30-35 °C.

As a negative control 100 ml of extraction liquid is filtered in the same way and the filter plated on TSA agar.

B) Verifica delle interferenze da parte del prodotto e/o liquido di estrazione /Verification of interferences from the product and/or extraction liquid

Le singole maschere sono estratte con 300 ml di liquido di estrazione (1 g/l di peptone, 5 g/l di NaCl e 2 g/l di Tween 20) all'interno di un contenitore sterile posto ad agitare per 5 minuti su oscillatore orbitale, 250 rpm. Dopo questa fase di estrazione, sotto cappa a flusso laminare aliquote di 100 ml del liquido di estrazione sono inoculate con 50 – 100 UFC dei seguenti ceppi. Ogni aliquota è quindi filtrata attraverso un filtro da 0,45 μ m su piastre di

terreno agarizzato, TSA o SDA con cloramfenicolo a seconda del ceppo, e incubate come descritto nella seguente tabella.

Masks are extracted by 300 ml of extraction liquid (1 g/l Peptone, 5 g/l NaCl and 2 g/l of Tween 20) in a sterile container laid down on an orbital shaker for 5 minutes, 250 rpm. The bottle is laid down on an orbital shaker and shaken for 5 min. After this extraction step, under a laminar flow bench 100 ml aliquots of the extraction liquid are inoculated with 50 – 100 CFU of the following microorganisms. Each aliquot is filtered through a 0,45 µm filter and laid down on agar plate, TSA or SDA with cloramphenicol based on the inoculated microorganism and incubated as follows.

CEPPO STRAIN	Terreno di crescita Growth Medium	Condizioni di incubazione Growth conditions
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Tryptic soy agar (TSA)	30°C-35°C ≤ 3 giorni /days
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Tryptic soy agar (TSA)	30°C-35°C ≤ 3 giorni /days
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Tryptic soy agar (TSA)	30°C-35°C ≤ 3 giorni /days
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Sabouraud-dextrose agar (SDA)	20°C-25°C ≤ 5 giorni /days
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Sabouraud-dextrose agar (SDA)	20°C-25°C ≤ 5 giorni /days

Elaborazione e interpretazione dei risultati/Results elaboration and interpretation

A) Verifica dell'efficacia di recupero del metodo di valutazione della pulizia microbica / Evaluation of bioburden method recovery efficiency

Per ogni maschera testata viene calcolata l'efficienza di recupero (in %) rapportando il numero di colonie recuperate nella prima estrazione con il numero totale di colonie recuperate nelle estrazioni ripetute. L'efficienza di recupero del metodo è calcolata considerando la media delle percentuali ottenute per ogni singola maschera, applicando il seguente calcolo:

Sede legale e laboratori

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

Tel. +39 0323 586239
Fax +39 0323 496877
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, 20090
Vimodrone (MI), Italia

www.abich.it

Efficienza di recupero = (100 / Media dei recuperi della prima estrazione in %)

Il valore di efficienza di recupero ottenuto per i microorganismi aerobi è applicabile a tutti i tipi di contaminanti, poiché l'efficienza di recupero dipende dalle proprietà di adesione del microorganismo al prodotto, proprietà indipendenti dal tipo di microorganismo. Il valore di efficienza di recupero ottenuto sarà quindi applicato come fattore di correzione nella valutazione dei risultati di pulizia delle maschere ad uso medico analizzate con il metodo sopra descritto.

For each tested mask the recovery efficiency (as %) is calculated comparing the number of colonies recovered by the first treatment and the total number of colonies recovered by the consecutive extractions. The method recovery efficiency is calculated from the average recovery of the first extraction obtained in the tested masks, as follows:

Recovery efficiency = (100 / Average recovery first extraction (%))

The recovery efficiency obtained for aerobic microorganisms is valid for all types of microorganisms, since the recovery test measures the efficiency of the method to remove microorganisms based on their adhesion to the product, dynamics that generally apply to all types of microorganisms. The recovery efficiency will be applied as corrective factor of the bioburden results of masks analyzed as described above.

B) Verifica delle interferenze da parte del prodotto e/o liquido di estrazione /Verification of interferences from the product and/or extraction liquid

Per ogni ceppo testato la crescita osservata non deve differire di un fattore superiore a 2 rispetto all'inoculo effettuato affinché si possa dimostrare l'assenza di interferenze da parte del prodotto e/o liquido di estrazione.

The absence of interferences from the product and/or extraction liquid is demonstrated if the growth does not differ by a factor greater than 2 from the value of inoculum for each tested strain.

**Sede legale
e laboratori**

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

Tel. +39 0323 586239
Fax +39 0323 496877
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, 20090
Vimodrone (MI), Italia

www.abich.it

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

3.1 Risultati / Results

Di seguito si riportano i valori dei conteggi ottenuti nelle estrazioni ripetute /The counts obtained in the consecutive treatments are as follows:

Campione/sample	UFC/CFU/ mask 1	UFC/CFU/ mask 2	UFC/CFU/ mask 3	Totale dei trattamenti (UFC/CFU)	Primo trattamento/first treatment %
Campione /sample 1	9	6	3	18	50,0
Campione/sample 2	12	<3	3	17	70,6
Campione/sample 3	3	3	<3	8	37,5
Negative controls	Nessuna crescita /no growth				
Media dei recuperi del primo trattamento /Average recovery by first treatment					52.7
Efficienza di recupero /Recovery efficiency					1.9

Tab.1

Di seguito si riportano i valori dei conteggi ottenuti per ogni singolo ceppo nella verifica delle interferenze da parte del prodotto e/o liquido di estrazione ripetute /The counts obtained for each tested strain in the verification of interferences from the product and /or extraction liquid are as follows:

CEPPO/ STRAIN	Inoculum (UFC/CFU)	Risultato/result (UFC/CFU)	Limiti /Limits	Conforme/NON CONFORME/PASS/FAIL
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	50	40	50% - 100% dell'inoculo / from the inoculum	CONFORME/PASS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	30	22		CONFORME/PASS
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	48	30		CONFORME/PASS
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	34	24		CONFORME/PASS
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	50	32		CONFORME/PASS

Tab.2

Sede legale
e laboratori

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

Tel. +39 0323 586239
Fax +39 0323 496877
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, 20090
Vimodrone (MI), Italia

www.abich.it

3.2 Conclusioni / Conclusions

Sulla base dei risultati ottenuti il metodo di controllo della pulizia microbica secondo normativa UNI EN ISO 14683:2019 / *On the base of the obtained results the microbial cleanliness method described in UNI EN ISO 14683: 2019*

sul prodotto testato /on the tested product:

Mascherine riutilizzabili Holly by Pasini - sanitizzata con amuchina
Batch: n.p.
Internal code: 1229/20-03

risulta validato secondo la normativa EN ISO 11737-1: 2018 / *is validated in accordance with EN ISO 11737-1: 2018*

con un'efficienza di recupero uguale a **1.9** /with a recovery efficiency of **1.9**.

Questo valore può essere applicato come fattore di correzione per una stima più accurata della pulizia microbica del prodotto / *This value can be applied as a corrective factor for a more accurate estimate of the product microbial cleanliness.*

Data/Date: 14/05/2020

Direttore dello studio
Study Director
Dr. 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

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, 20090
Vimodrone (MI), Italia

www.abich.it

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

1. UNI EN ISO 11737-1: 2018 - Sterilization of health care products -- Microbiological methods Determination of a population of microorganisms on products.
2. EN 14683: 2019 – Medical face Masks – Requirements and test methods.
3. European Pharmacopoeia 10.0 – chapter 2.6.12 “microbiological examination of non-sterile products: Microbial Enumeration tests”.

Sede legale e laboratori

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

Tel. +39 0323 586239
Fax +39 0323 496877
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, 20090
Vimodrone (MI), Italia

www.abich.it