GHA EUROPE S.r.l.
Via Piemonte 7/1A - 40069 ZOLA PREDOSA (Bologna) – Italy
P.IVA e CF 02478641208
Tel. 051/3514051 Fax 051/752893
e-mail info@gha-europe.com - www.gha-europe.com - www.lepentoledellasalute.it

Valutazione Effetto Battericida su Trattamento GHA

(a cura del centro servizi analisi e prove di GHA Europe)

Cos'è il trattamento GHA: tecnologia-proprietà-applicazioni .....pag. 1-2-3
Le Malattie Trasmesse da Alimenti (MTA).....pag. 4
Classificazione delle MTA.....pag. 4
L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) .....pag. 5
La contaminazione degli alimenti .....pag. 5
Ceppi microbici presi in considerazione dalla norma ISO 22196 .....pag. 6

Principali batteri esaminati
Escherichia Coli .....pag. 7
Salmonella Typhimurium .....pag. 7
Stafilococcus Aureus.....pag. 8
Legionella Pneumophila .....pag. 9
Pseudomonas Aeruginosa .....pag. 9
Candida Albicans .....pag. 10

Aspetti Normativi (ISO 22196 e JIS 2801).....pag. 11
Metodo di Analisi della norma ISO 22196: 2011 .....pag. 11
Metodo utilizzato per verificare l'efficacia del trattamento GHA .....pag. 12
Schema semplificato dei principali step di analisi .....pag. 13
Risultati delle analisi sulle proprietà antibatterio di GHA .....pag. 14-15

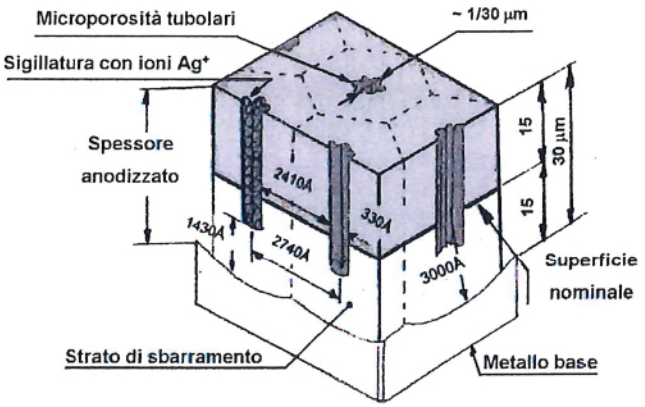
Piastre Petri di:
Escherichia Coli-Strafilococco Aureus- Candida Albicans .....pag. 16

Certificati rilasciati da Lab. 3A certif. ACCREDIA su Antibatterio/GHA
Certificato antibatterio Pseudomonas Aeuruginosa .....pag. 17
Certificato antibatterio Escherichia Coli .....pag. 18
Certificato antibatterio Salmonella Typhimurium .....pag. 19
Certificato antibatterio Strafilococco Aureus .....pag. 20
Certificato antibatterio Candida Albicans .....pag. 21
Certificato antibatterio Legionella Pneumophila .....pag. 22

Cos'è il trattamento GHA

G.H.A.® è la più recente ed innovativa tecnologia applicabile alle superfici di tutte le leghe a base alluminio. Consiste in uno speciale trattamento di ossidazione anodica, con spessore da 1 a 200µm, a cui segue una sigillatura delle microporosità mediante ioni d'argento (Ag^+).

Le leghe di alluminio a causa della loro scarsa durezza hanno una superficie estremamente vulnerabile al graffio ed all'usura abrasiva, inoltre tendono ad ossidarsi spontaneamente innescando anche pericolosi fenomeni di corrosione, sia diffusa che localizzata (Pitting), per questa ragione sui corpi di alluminio si prevede sempre una protezione come verniciatura, cromatura, nichelatura, ossidazione anodica, etc.



L'Ossidazione Anodica è per le leghe a base alluminio il trattamento protettivo più congeniale e sicuro fra tutti gli altri perché è inasportabile, infatti l'alluminio della base si trasforma, durante il processo galvanico, in ossido di alluminio (Al_2O_3), generando uno strato protettivo di tipo ceramico molto duro, refrattario al calore ed inasportabile. I cristalli dell'ossido di alluminio (Al_2O_3) hanno una struttura a nido d'ape con cristalli ottaedrici molto dura e compatta, con un foro capillare al centro degli ottaedri che penetra quasi fino alla base degli stessi. Purtroppo la porosità dei cristalli dell'ossido anodico costituisce un vero e proprio difetto che ne limita le applicazioni, specie nei casi in cui le superfici siano soggette a sfregamento o debbano lavorare in ambienti corrosivi in quanto la base di alluminio viene a contatto, attraverso i pori, con l'ambiente corrosivo esterno. Questi pori sono anche ricettacolo di sporco e di batteri tanto che le superfici anodizzate si macchiano. Per questa ragione vengono spesso ricoperte con sostanze coloranti che sigillano i pori (nero o altri colori).

I ricercatori della società SOUKEN di Kyoto hanno studiato la possibilità di sigillare i pori dei cristalli degli ossidi anodici, mediante uno speciale processo galvanico impiegando ioni Ag^+, trasformando così quello che era considerato un difetto, la porosità, in un pregio in quanto queste costituiscono piccoli serbatoi per gli ioni Ag^+, risultando così uniformemente distribuiti sulla superficie e permanentemente presenti durante l'usura delle stesse. Il processo GHA (Golden Hard Anodizing) è stato poi brevettato in Giappone, Korea, Stati Uniti e Comunità Europea (Brevetto N. EP1207220). L'elevata durezza dell'ossido anodico, HV 500-600, unita alle straordinarie proprietà degli ioni d'argento, vedi tabella 1, conferiscono alla superficie trattata caratteristiche biotecnologiche di estremo interesse applicativo, vedi tabella 2, che vanno dal campo farmaceutico ed alimentare a quello tecnico e scientifico, vedi tabella 3. Senza dimenticare l'elevata durezza e la refrattarietà al calore che sono caratteristiche proprie degli ossidi anodici.

Tabella 1 - Proprietà trattamento GHA® con gli ioni Argento Ag^+
- Basso coefficiente d'attrito, autolubrificazione e resistenza all'usura.
- Resistenza alla corrosione
- Elevata conducibilità termica ed alto rendimento termodinamico
- Elevata capacità antistatica
- Capacità di assorbire calore e di rimetterlo con onde infrarosse
- Elevata capacità antibatterica ed antimuffa (Battericida)

Tabella 2 - Caratteristiche biotecnologiche

Materiale	Durezza HV	Temperatura di fusione	Coefficiente d'attrito	Capacità batteriostatica	Resistenza alla corrosione SST	Resistenza all'usura
Lega di alluminio	70÷100	680°C	0,44	nessuna	100 ore	10^2 ore
Ossido di alluminio con trattamento G.H.A.®	500÷550	2100°C	0,025	elevatissima	10.000 ore	10^5 ore
Ossidazione dura	500÷550	2100°C	0,15	nessuna	200 ÷ 500 ore	10^3 ore

Tabella 3 - Applicazioni trattamento GHA®
- componenti di macchine industriali - componenti automotive - componenti di macchine per ufficio - elementi per la cucina ed elettrodomestici - componenti per l'abitazione e relativi accessori - componenti per l'elettronica-semiconduttori - termoradiatori, scambiatori termici, pannelli solari - abbigliamento, coperte elettriche, tappeti - filtri per condizionatori d'aria

Tabella 4 - Risultati di prove tribologiche su 3 coating antiusura			
Campione di Anticorodal 100 con coating di:	**Durezza Riporto $HV_{0,05/15"}$**	**ΔPeso (gr.)**	**Profondità solco**
GHA®	520	0,0006	4 µm
NICHEL-TEFLON	730	0,0013	19,5 µm
NICHEL CHIMICO	780	0,0025	30 µm

Pertanto il trattamento GHA in combinazione di una appropriata lega leggera può essere considerato, da parte dei progettisti, un vero e proprio nuovo materiale e può rappresentare una valida alternativa sia a materiali costosi come leghe di Titanio o acciai inox o ad acciai rivestiti di coating blasonati e costosi come TIN – PVD – CVD – Cromo duro – Nichel chimico – Nichel-Teflon etc

Le Malattie Trasmesse da Alimenti (MTA)

Queste patologie rappresentano tutt'oggi un importante problema di salute pubblica, causate principalmente da fattori culturali e demografici così come dall'aumento della mobilità delle persone e delle merci in tutto il mondo. In passato gli episodi di malattie alimentari erano più limitate, per la maggior parte avvenivano in famiglia o in collettività, dovuti soprattutto ai comportamenti famigliari e alle tecniche di conservazione degli alimenti preparati in casa. Le MTA mostrano nella maggior parte dei casi una maggiore incidenza e mobilità in certi gruppi di persone come anziani, bambini, immunodepressi e donne incinte. La maggior parte di queste malattie ha un breve periodo di durata e un decorso autolimitante anche se alcuni patogeni, tuttavia, possono anche causare patologie croniche.

Classificazione delle MTA

Tra le principali malattie legate agli alimenti distinguiamo:

Infezioni Alimentari – causate principalmente dall'ingestione di microrganismi vivi che si moltiplicano e invadono l'ospite. Spesso si tratta di Microrganismi che vivono naturalmente nel tratto Enterico di Animali o Uomini (E.Coli, Salmonella, Campilobacter, ecc). Sono il più delle volte trasmessi per via oro-fecale a causa di scarse pratiche igieniche personali o da contaminazione di superfici di comune utilizzo come le maniglie delle porte, il manico del carrello della spesa, i soldi, la tastiera di un computer, la sedia sull'autobus.. La patogenicità il più delle volte è legata ai fattori di adesione batterica con i quali i patogeni causano danno cellulare alle pareti intestinali una volta ingeriti, come nel caso della dissenteria.

Tossinfezioni Alimentari – causate dall'ingestione di alimenti che contengono microrganismi che si moltiplicano nel nostro corpo producendo tossine. I Batteri generalmente penetrano nell'organismo e liberano la tossina (come il Clostridium Perfrigens). Spesso si tratta di malattie non gravi negli adulti sani, ma che possono assumere gravi caratteristiche in anziani e bambini e sono spesso caratterizzate da vere e proprie epidemie.

Intossicazioni Alimentari – dovute all'ingestione di una tossina preformata nell'alimento, la sola responsabile della patologia. Un esempio noto a tutti sono le intossicazioni da funghi velenosi o l'intossicazione da tossina botulinica in prodotti caserecci, preparati senza le dovute precauzioni o conservati in maniera inappropriata.

L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA)

L'EFSA è l'agenzia Europea che opera in maniera autonoma e in stretta collaborazione con le autorità nazionali, fornisce consulenza scientifica sulla sicurezza degli alimenti e dei mangimi. Istituita nel Gennaio del 2002 da allora pubblica periodicamente un rapporto sui casi di Malattie Trasmesse da Alimenti che avvengono all'interno dello spazio europeo. Recentemente sono stati riportati più di 50.000 casi di MTA umani di cui più di 5.000 hanno portato all'ospedalizzazione degli affetti e a 41 al decesso (dati relativi all'anno 2012).

La contaminazione degli alimenti

Prima di tutto bisogna tenere bene in mente che non è necessario essere ammalati per liberare nell'ambiente agenti patogeni, infatti molti di questi possono vivere nel nostro cavo orale, come la Stafilococco, o nel nostro intestino, Escherichia Coli, anche senza che ce ne rendiamo conto e li possiamo immettere inconsapevolmente nell'ambiente circostante. Batteri, virus, tossine e vari contaminanti di natura chimica sono tra i principali agenti eziologici delle MTA, che possono contaminare gli alimenti in diversi momenti, durante la produzione, lavorazione, preparazione, conservazione, trasporto o distribuzione del cibo. È dunque facile intuire che esistano differenti modalità di contaminazione, distinguibili in:

Contaminazione Primaria – quando le materie prime racchiudono in sé l'agente contaminante, come ad esempio residui chimici in latte, frutta e uova oppure carne contaminata da mangimi di scarsa qualità;

Contaminazione Secondaria – quando le pratiche di lavorazione causano una contaminazione della materia prima (direttamente o indirettamente) attraverso attrezzature non adeguatamente sterili o scarsa igiene del personale addetto. In questi casi la contaminazione può avvenire tramite microrganismi provenienti da infezioni dell'apparato respiratorio e del cavo orale, come bronchiti e tonsilliti, da batteri presenti nelle feci, caso di malattie a trasmissione oro-fecale come la salmonella, o da batteri provenienti da lesioni della cute.

Ceppi microbici presi in considerazione dalla norma ISO 22196

La norma ISO 22196 da noi presa in considerazione pone come criterio base per questo tipo di indagine l'analisi di due specie batteriche; un Gram-positivo e un Gram-negativo considerati tra i più rappresentativi (tabella 5).

Nome	Ceppo
Escherichia Coli (*Gram* -)	ATCC 8739 CIP 53.126 DSM 1576 NBRC 3972 NCIB 8545
Staphylococcus aureus (*Gram* +)	ATCC 6538P CIP 53.156 DSM 346 NBRC 12732 NCIB 8625

Tabella 5 – ceppi batterici presi in considerazione dalla norma ISO 22196

Tra i ceppi Batterici più coinvolti nelle MTA, i coliformi fecali sono il gruppo più rappresentato, appartengono alla famiglia delle Enterobacteriaceae e vivono principalmente nell'intestino dell'uomo come anche in altri animali a sangue caldo. Sono Batteri generalmente a forma di bastoncello, aerobi-anaerobi facoltativi, non sporigeni, in grado di vivere alla temperatura di 44,5°C. Avendo un habitat prevalentemente intestinale sono considerati un buon rivelatore di contaminazione fecale per gli alimenti quando rilevati. Tra questi sono stati analizzati due dei più rappresentativi membri di questo gruppo: Escherichia Coli e Salmonella.

In questo studio sono stati presi in considerazione anche batteri responsabili di affezioni del tratto respiratorio come Legionella e Stafilococco Aureus e altri considerati patogeni opportunisti dell'uomo, ovvero responsabili di patologie che insorgono solo in presenza di specifiche caratteristiche predisponenti come negli anziani, negli immunodepressi, negli affetti da malattie gravi croniche o nelle

persone sottoposte a cure antibiotiche prolungate. Tra questi sono stati presi in considerazioni il batterio Pseudomonas Auruginosa e il fungo Candida Albicans.

Escherichia Coli

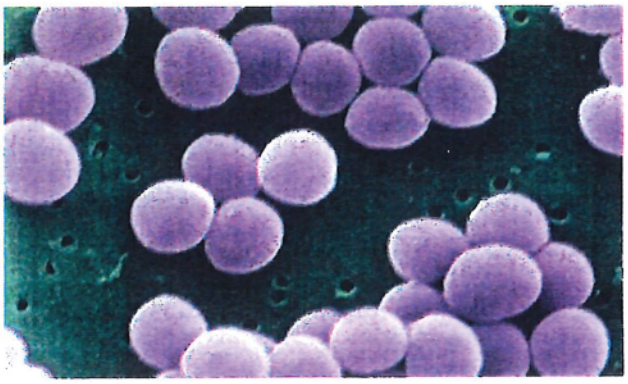
Considerato a livello scientifico il più rappresentativo tra i coliformi fecali, prende il nome dal suo scopritore, l'austriaco Theodor Escherich. Si tratta di un batterio Gram-negativo, con capacità aerobia-anaerobia facoltativa. Al mondo ne esistono tante varianti, distinti almeno in 171 sierotipi ognuno con una diversa combinazione di antigeni (suddivisi in O, H, K, F). È uno dei più versatili patogeni presenti nel corpo umano e possedendo diversi fattori di patogenicità può provocare una serie molto varia di quadri morbosi. Possiamo distinguere stipiti denominati **uropatogeni,** perché responsabili della maggior parte delle infezioni endogene delle vie urinarie, ed **enteritogeni**, responsabili di enteriti spesso in conseguenza ad infezioni esogene contratte per l'ingestione di alimenti contaminati. Tra questi assumono un ruolo di rilievo 4 gruppi distinti per la loro patogenicità: gli Enteropatogeni (EPEC), Enterotossigeni (ETEC), Enteroinvasivi (EIEC) ed Enteroemorragici (EHEC). I primi due (EPEC, ETEC) non producono tossine e la loro azione patogena è legata al danneggiamento diretto o indiretto delle mucose intestinali, mentre nei restanti due gruppi (EIEC, EHEC) giocano un ruolo essenziale la produzione di tossine.

Salmonella Typhimurium

Sono bacilli Gram negativi, asporigeni, anaerobi facoltativi provvisti di flagelli laterali, quindi a differenza di altri, sono in grado di muoversi all'interno dell'organismo una volta ingeriti. Generalmente presenti nell'intestino di persone ammalate o infette, vengono suddivisi in sierotipi patogeni esclusivi per l'uomo, come S.typhi e S. paratyphi, o esclusivi per gli animali. Possono causare Salmonellosi minori come rare e più

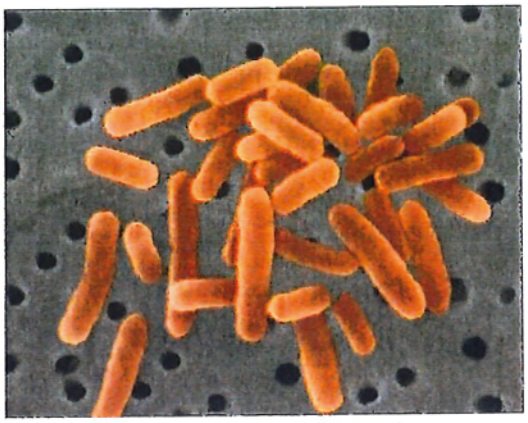
gravi febbri tifoidi. Il periodo di incubazione in ogni caso è molto breve e i primi sintomi interessano il tratto gastro-intestinale con dolore addominale, nausea, vomito, febbre e diarrea.

Stafilococco Aureus



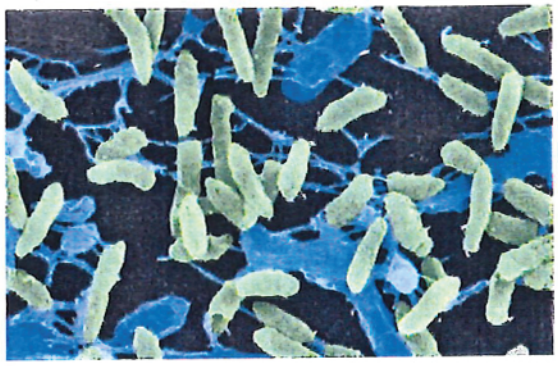
È un batterio di forma sferica, spesso riunito in ammassi irregolari dalla forma di grappoli d'uva.
È immobile, Gram-positivo, aerobio-anaerobio facoltativo, non sporigeno, il suo sviluppo ha luogo tra i 10° e i 45°C con un optimum di temperatura tra i 30° e i 37°C. Essendo normalmente presente a livello della cute e della mucosa nella porzione anteriore del naso e della faringe nella maggioranza dei soggetti adulti è facile immaginare come l'uomo sia continuamente esposto al rischio di infezione. Le patologie che ne conseguono si differenziano notevolmente in funzione della sede del processo infettivo. Esistono sino a 30 specie, alcune delle quali possono provocare intossicazioni e manifestazioni morbose di vario tipo a causa di alcuni caratteristici enzimi capaci di danneggiare altre cellule e alcune *esotossine* in grado di diffondersi ai tessuti limitrofi. Tra queste possono essere riscontrate *citolisine,* tossine in grado di aggredire le cellule dell'ospite uccidendole ed *enterotossine* che esplicano la loro azione tossica a livello della mucosa gastrointestinale. Oltre a queste possono essere prodotte anche *tossine epidermolitiche*, dette anche esfoliative, responsabili della necrosi epidermica e *tossine dello shock tossico.* Caratteristica purtroppo spesso frequente in questi batteri è l'antibiotico resistenza, soprattutto rispetto alle cosiddette infezioni nosocomiali (contratte durante un periodo di permanenza in ospedale), costituendo tutt'oggi un problema sanitario da non sottovalutare.

Legionella Pneumophila



Battere appartenente alla famiglia delle Legionellaceae, denominazione creata appositamente nel 1979 per comprendere un nuovo batterio che poco tempo prima aveva provocato una forma di polmonite manifestatasi in forma di focolaio epidemico in un gruppo di veterani della America Legion da cui prese il nome (l'epidemia o malattia dei legionari). È un battere Gram-negativo, occasionalmente mobile di cui si conoscono almeno 30 specie diverse distinte in 50 sierotipi diversi. Presenti soprattutto in ambienti acquatici naturali o artificiali come impianti idrici degli edifici, serbatoi, impianti di condizionamento (ambiente ed auto), tubature, fontane e piscine, possono sopravvivere con una temperatura dell'acqua tra i 5° e i 55°C con un optimum di temperatura per il loro sviluppo tra i 25° e i 42°C. L'infezione avviene tramite aerosol, piccole goccioline di acqua in sospensione, e può causare due differenti quadri clinici: la Legionellosi, una malattia grave che può portare cefalee, tosse, sintomi gastro-intestinali e neurologici e la febbre di Pontiac, una malattia che si risolve in 2-5 giorni con febbre, malessere generale e cefalee.

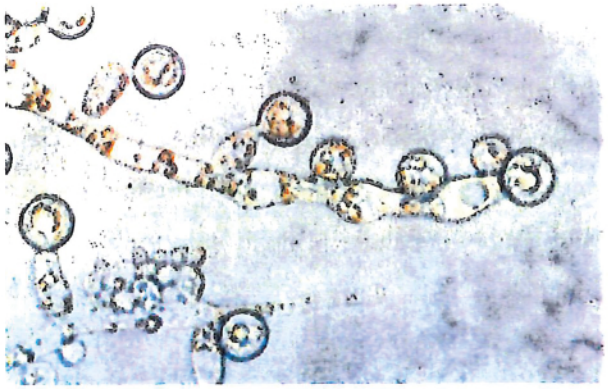
Pseudomonas Aeruginosa



Si tratta di Bacilli Gram-negativi, in genere mobili per la presenza di un flagello polare, aerobianaerobi facoltativi. Come conseguenza delle sue scarse esigenze nutrizionali e della sua capacità di adattarsi a diverse realtà ambientali viene definito ubiquitario, occasionalmente evidenziato anche come commensale transitorio delle prime vie aeree e nel materiale fecale nell'uomo. Anch'esso viene definito come un batterio opportunista perché non riesce generalmente a provocare infezioni nell'uomo se non in seguito a circostanze favorenti come traumi, ustioni, immunodepressione, AIDS. Causa soprattutto affezioni alle basse vie respiratorie in soggetti con

condizioni predisponenti e infezioni osteo-articolari. L'azione patogena è determinata dalla produzione di numerose sostanze tra cui tossine come *l'esotossina-A*, tossine *citolitiche*, in grado di aggredire le cellule dell'ospite uccidendole e numerose sostanze favorenti l'adesione e la dissoluzione delle membrane cellulari.

Candida albicans



È un fungo saprofita appartenente al gruppo dei miceti lievitiformi (classe: Saccharomycetes, famiglia: Debaryomycetaceae). È un abituale commensale della cute e delle mucose del cavo orale, del tratto gastrointestinale e genitale. Come tutti i patogeni opportunisti questi lieviti endogeni sono in grado di esplicare la loro virulenza purché coesistano le indispensabili condizioni predisponenti come nel caso di individui debilitati, immunodepressi o sottoposti a lunghe cure antibiotiche come anche individui sottoposti a stress prolungati e intensi (stress da studio nello studente, stress da lavoro per chi svolge un mestiere pesante o intenso). Può diventare patogeno nell'uomo provocando Candidosi, presentandosi come una affezione delle mucose (mughetto, vulvovaginiti), della pelle e delle unghie (onicomicosi). Si moltiplica in modo anomalo e attraverso l'intestino può raggiungere il sistema circolatorio liberando tossine causa di Candidemia con gonfiore addominale, rallentamento della digestione, stipsi, diarrea, stanchezza, irritabilità, insonnia, mal di testa e depressione.

Aspetti Normativi

L'Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (ISO) crea e pubblicizza norme internazionali, requisiti, linee guida e parametri allo scopo di fornire un criterio univoco e razionale per garantire chiarezza e sicurezza nel lavoro. La creazione di Standard Internazionali favorisce quindi lo scambio di idee e incentiva il mercato minimizzando gli errori ed evitando le incertezze. La normativa a cui abbiamo fatto riferimento è la ISO 22196:2011, relativa alla misurazione dell'attività antibatterica su superfici plastiche, la quale a sua volta si basa sul metodo della precedente JIS Z 2801:2010. Queste norme pongono le linee guida sui metodi di analisi da eseguire, sui materiali e i criteri di valutazione per interpretare i risultati in modo da fornire un criterio univoco e uno standard per l'analisi.

Metodo di Analisi della norma ISO 22196:2011

Il metodo prevede che l' analisi sia eseguita almeno su TRE repliche per ogni campione trattato e su SEI repliche dello stesso campione non trattato (Bianco). La metà delle sei repliche non trattate vengono usate per la determinazione delle cellule batteriche vitali subito dopo l'inoculazione (Tempo zero), mentre le restanti tre vengono utilizzate per la conta del numero di cellule vitali dopo incubazione per 24h. L'utilizzo di almeno tre repliche per campione di prova contribuisce a ridurre la variabilità del test eliminando dalla valutazione finale eventuali Falsi-negativi e/o Falsi-positivi. I materiali da sottoporre ad analisi, trattati e non trattati, devono rispettare degli standard comuni, tra cui la grandezza del campione che in questo caso deve essere di (50 ± 2) mm per lato e non superiore i 10mm di spessore, così come, salvo diverse indicazioni, le dimensioni del film protettivo che ricopre il campione, (40 ± 2) mm per lato.

(Vedi Figura 1).

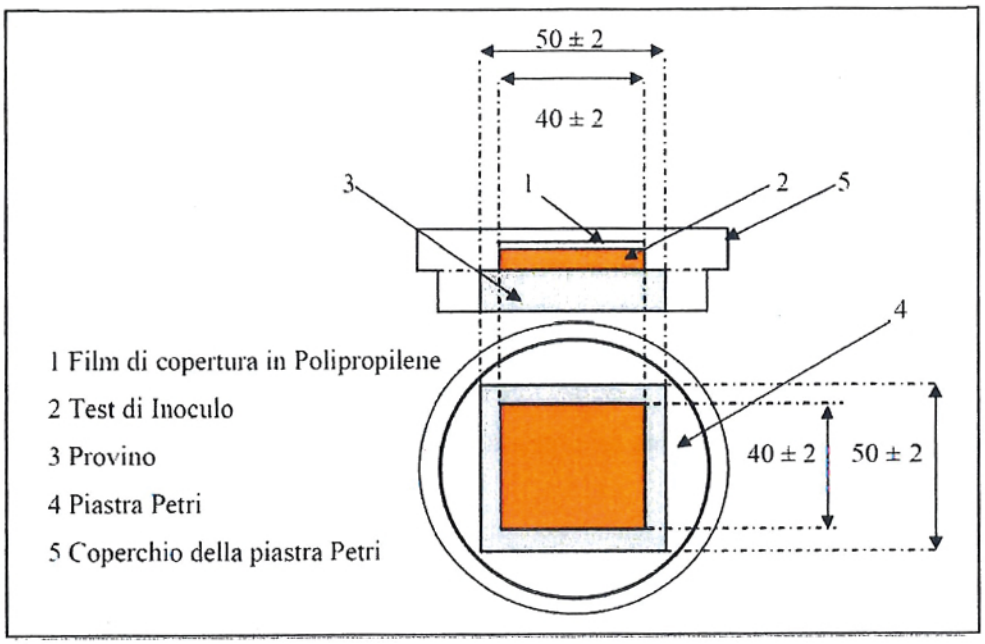
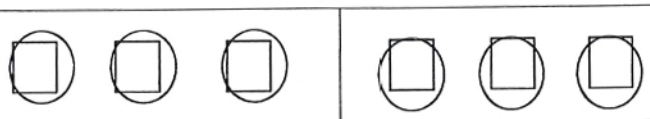


Figura 1 – Caratteristiche standard del campione da analizzare

Metodo utilizzato per verificare l'efficacia del trattamento GHA

Una volta preparate le colture Batteriche c avviene la semina dei provini trattati con una diluizione a concentrazione nota della sospensione batterica. Il campione viene ricoperto da un sottile film che può essere di polietilene, polipropilene o poliestere. Una volta premuto delicatamente il film, garantendo all'inoculo di prova di diffondere in maniera omogenea sino ai margini del coprioggetto, tre piastre Petri dei sei Bianchi vengono immediatamente "lavate" tramite una leggera agitazione meccanica aggiungendo 10 ml di un brodo di coltura standard chiamato SCDLP che ha la duplice funzione di evitare crossreazioni tra ceppi batterici inoculati ed eventuali contaminanti. Questa fase detta di "lavaggio" permette di raccogliere i batteri a inizio test (Tempo 0). Le 6 piastre Petri, contenenti i campioni inoculati e i 3 brodi di coltura, vengono richiuse ed incubate ad una temperatura di (35 ± 1)°C, ad una umidità relativa non inferiore a 90% per (24 ± 1)h. Trascorse 24 ore, le 3 piastre Petri contenenti i brodi di coltura vengono analizzate per effettuare la conta delle colonie batteriche relative alla contaminazione dei Bianchi a Tempo Zero mentre i restanti campioni vengono a loro volta "lavati" con brodo SCDLP, spatolati su nuove piastre Petri ed incubati per altre 24h. Dopo quest'ultima incubazione, avviene la conta delle colonie batteriche sulle restanti Piastre, mettendo infine a confronto quelle derivanti dai

campioni GHA e dai Bianchi per verificare se vi sia stata o meno crescita (vedi schema riassuntivo dell'analisi eseguita).

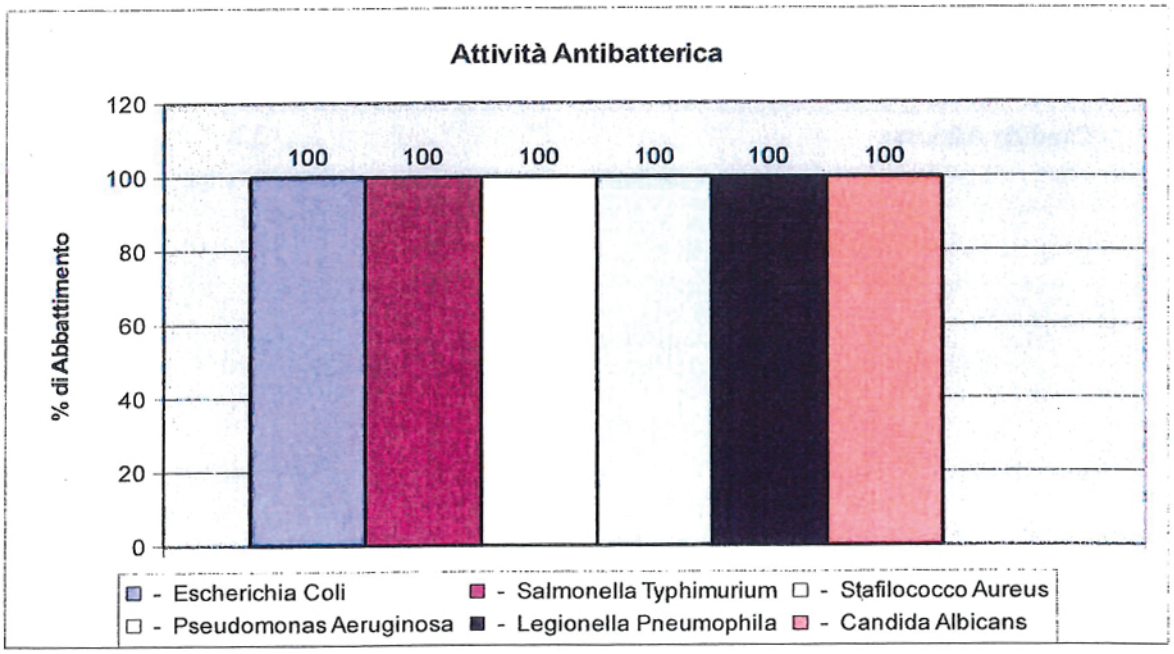
Schema semplificato dei principali step di cui è composta l'analisi		
	Campioni Trattati	***Campioni Non Trattati (Bianchi)***
		
Step 1	Semina a concentrazione nota del preparato batterico e copertura di tutti i provini con un film in Polipropilene,	
Step 2		Lavaggio di 3 Bianchi con 10 ml di SCDLP e semina su piastra Petri per successiva determinazione della concentrazione batterica a Tempo Zero (T0)
Step 3	Incubazione a (35 ± 1)°C per (24 ± 1)h ad una umidità relativa non inferiore a 90% di tutti i campioni.	
Step 4		Valutazione dei tre Bianchi per il conteggio delle colonie batteriche a T 0
Step 5	Lavaggio dei 3 Campioni trattati e dei 3 Bianchi rimasti con 10 ml di SCDLP e semina su piastre Petri	
Step 6	Incubazione a (35 ± 1)°C per (24 ± 1)h ad una umidità relativa non inferiore a 90% dei campioni rimasti	
Step 7	Valutazione delle piastre Petri (relative ai Campioni trattati e ai Bianchi) per la rilevazione e conteggio delle colonie batteriche a T 24h	

Risultati

L'attività antibatterica (R), come evidenziato nelle norme ISO 22196:2011 e JIS 2801:2010, definisce come BATTERICIDA una sostanza che abbia un valore R≥2,0. Seguendo i parametri d'analisi e i canoni di determinazione di queste norme, il prodotto GHA da noi sottoposto a prova ha dimostrato efficacia BATTERICIDA su tutti i campioni testati (Vedi tabella 6).

Tabella 6 - Determinazione dell'attività antibatterica su Campioni Trattati a 25 µm

Batteri Testati	R	Attività Antibatterica % abbattimento
- Escherichia Coli	3,6	100
- Salmonella Typhimurium	3,3	100
- Stafilococco Aureus	4,2	100
- Pseudomonas Aeruginosa	2,6	100
- Legionella Pneumophila	2,9	100
- Candida Albicans	3,1	100

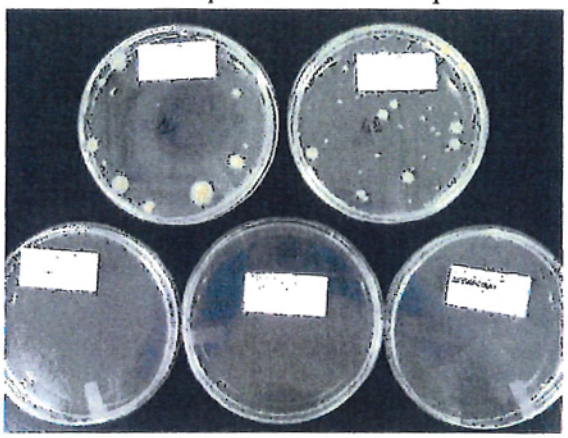


Abbiamo inoltre testato l'attività battericida dei nostri campioni GHA considerando diversi spessori di trattamento (10µm, 25µm, 40µm) per valutarne l'efficacia e, come si può notare in Tabella 7, la determinazione dell'attività antibatterica (R) è rimasta costante per ogni ceppo, confermando che l'attività battericida del GHA è strettamente legata al trattamento a prescindere dallo spessore.

Tabella 7 - Determinazione dell'attività antibatterica (R) = $(U_t - U_0) - (A_t - U_0)$	
Campioni trattati a 10µm	**R**
- Escherichia Coli	3,3
- Stafilococco Aureus	4,2
- Candida Albicans	3,2
Campioni trattati a 25µm	
- Escherichia Coli	3,6
- Stafilococco Aureus	4,2
- Candida Albicans	3,1
Campioni trattati a 40µm	
- Escherichia Coli	3,3
- Stafilococco Aureus	4,2
- Candida Albicans	3,2

ESCHERICHIA COLI

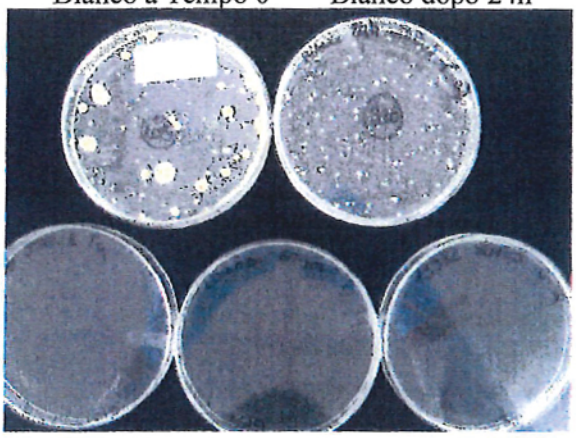
Bianco a tempo 0 Bianco dopo 24 h



Campioni trattati dopo 24 h

STAFILOCOCCO AUREUS

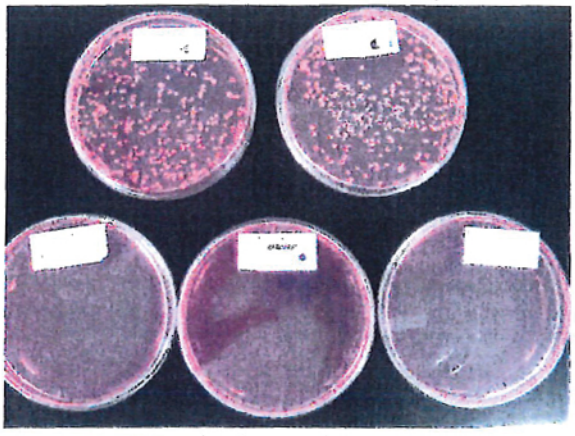
Bianco a Tempo 0 Bianco dopo 24h



Campioni trattati dopo 24h

CANDIDA ALBICANS

Bianco a Tempo 0 Bianco dopo 24h



Campioni trattati dopo 24h

3A Laboratori

ACCREDIA

LAB N° 1165

Test report n° **15LA13581** of **09/11/2015**

Spett.
GHA Europe srl
Via Piemonte 7/1A
40069 Zola Predosa (BO)

Sample Information

Test subject **Generic Material**

Description **Treated sample - 25µm - Closed pore**

Registration date **14/10/2015**

Date of arrival **14/10/2015** Hour of arrival: **11.30.00**

Date analysis commenced: **21/10/2015** Date analysis completed: **29/10/2015**

Sampling data

Date: **12/10/2015**

Sample supplied by: **Client**

Transport: **Client**

Parameter *Method*	U.M.	Result	LoQ
Determination of antibacterial activity (R) - R=(Ut-Uo)-(At-Uo) ISO22196:2011		**2,6**	0.6
Size of test specimens (H x L)	mm	**50x50**	
Thickness of test specimens	mm	**2,0**	
Type of polymer used for the cover film		**polypropylene**	
Size of the cover film (H x L)	mm	**40x40**	
Thickness of the cover film	mm	**0,10**	
Type of Gram-negative strain		**Pseudomonas aeruginosa ATCC**	
Volume of test inoculum	ml	**0,3**	
Number of viable bacteria in the test inoculum	n°	**200000**	
Uo - N° of viable bacteria recovered from the untreated test specimens after	log	**4,1**	1
Ut - N° of viable bacteria recovered from the untreated test specimens after 24	log	**4,3**	1
At - Count bacteria recovered from the treated samples 24 hours post	log	1.7	1

LEGEND: **U.M.** = Unit of measurement. **(Sup)** = upper limit, **(Inf)** = Lower Limit ,, **x + y** = acceptable range. **LoQ** = limit of quantification: the threshold value below which you choose not to bring any numerical result for the parameter in question, this limit is provided directly by the method, or is chosen on the basis of the experimental detection limits (LoQ or LoD) so as not to be changed over time or according to the chemical-physical or microbiological single sample. **LOD** = limit of detection. **NQ** = unquantifiable indicates a value less than LoQ

"<x" or ">x" respectively indicate a value lower or higher than the measuring range of the test

UNLESS OTHERWISE SPECIFIED quantitative microbiological tests (excluding MPN) are performed on single replica and two consecutive dilutions in accordance with ISO 7218: 2013, the results of this test report are not correct for recovery factors (R) as the values of recovery are in the tolerance specified in the test method; summations are calculated using the criterion of the lower bound (LB)

The results marked in red indicate a exceeding the defined limits.

If the sampling isn't the responsibility of 3ALaboratori Ltd., the test results were obtained on the basis of the data declared

Note:

The product tested is considered effective when the antibacterial activity value is R >= 2.0 (as suggested by the standard JIS 2801:2010)

Technical Director

Dr. Giovanni Mitarttonna
Chemist
Ordine Interprov. Chimici del Veneto - Padova n° 910 SEZ. A

The analytical results are exclusively referred to the sample
Representation of a Test Report signed electronically in accordance with current legislation
The test report can not be reproduced in part without the written permission of the laboratory.

Laboratory management system certified UNI EN ISO 9001: 2008 by CSQA with the No. 14270. Laboratory in the list of regional laboratories carrying out analysis in the context of test control procedures for Food Industries No. 52. Recommended by AIC for the analysis of quantification of gluten in food matrices. Registrated laboratory for the analysis of food contact materials intended for export to Japan

Mod P701.01 Rev.4

3A-Laboratori SRL
Via A.Vesta 1/d Maserà di Padova - 35020 (PD) Email amministrazione1@3alaboratori.it Tel. 049 8864658-8864671 Fax 049 8869436
Cap. Soc. 6100000.00 I.V. - REA di PD 325462 - Codice Fiscale Iscriz. Reg. Imprese di Padova e Partita Iva 04293730288

3A Laboratori

LAB N° 1165

Test report n°: **15LA10381** of **09/11/2015**

Spett.
GHA Europe srl
Via Piemonte 7/1A
40069 Zola Predosa (BO)

Sample Information

Test subject: **Generic Material**

Description: **Treated sample - 25µm - Closed pore**

Registration date: **31/07/2015**

Date of arrival: **31/07/2015**

Date analysis commenced: **21/09/2015** Date analysis completed: **28/09/2015**

Sampling data

Date: **31/07/2015**

Sample supplied by: **Client**

Transport: **Client**

Parameter *Method*	U.M.	Result	LoQ
Determination of antibacterial activity (R) - R=(Ut-Uo)-(At-Uo) *ISO22196:2011*		**3,6**	0.6
Size of test specimens (H x L)	mm	**50x50**	
Thickness of test specimens	mm	**2,0**	
Type of polymer used for the cover film		**polypropylene**	
Size of the cover film (H x L)	mm	**40x40**	
Thickness of the cover film	mm	**0,10**	
Type of Gram-negative strain		**Escherichia coli - ATCC 25922**	
Volume of test inoculum	ml	**0,3**	
Number of viable bacteria in the test inoculum	n°	**130000**	
Uo - N° of viable bacteria recovered from the untreated test specimens after	log	**3,9**	1
Ut - N° of viable bacteria recovered from the untreated test specimens after 24	log	**3,6**	1
At - Count bacteria recovered from the treated samples 24 hours post	log	< 1.0	1

LEGEND: **U.M.** = Unit of measurement; **(Sup)** = upper limit; **(Inf)** = Lower Limit ;; **x ÷ y** = acceptable range; **LoQ** = limit of quantification, the threshold value below which you choose not to bring any numerical result for the parameter in question; this limit is provided directly by the method, or is chosen on the basis of the experimental detection limits (LoQ or LoD) so as not to be changed over time or according to the chemical-physical or microbiological single sample; **LOD** = limit of detection; **NQ** = unquantifiable, indicates a value less than LoQ
"<x" or ">x" respectively indicate a value lower or higher than the measuring range of the test
UNLESS OTHERWISE SPECIFIED: quantitative microbiological tests (excluding MPN) are performed on single replica and two consecutive dilutions in accordance with ISO 7218: 2013; the results of this test report are not correct for recovery factors (R) as the values of recovery are in the tolerance specified in the test method; summations are calculated using the criterion of the lower bound (LB)
The results marked in red indicate a exceeding the defined limits.
If the sampling isn't the responsibility of 3ALaboratori Ltd , the test results were obtained on the basis of the data declared.

Note:
The product tested is considered effective when the antibacterial activity value is R >= 2.0 (as suggested by the standard JIS 2801:2010)

Technical Director

Dr. Giovanni Mitaritonna
Chemist
Ordine Interprov. Chimici del Veneto - Padova n° 910 SEZ. A

The analytical results are exclusively referred to the sample
Representation of a Test Report signed electronically in accordance with current legislation.
The test report can not be reproduced in part without the written permission of the laboratory.

Laboratory management system certified UNI EN ISO 9001 2008 by CSQA with the No. 1427/0. Inclusion in the list of regional laboratories carrying out analyses in the context of self-control procedures for Food Industries No. 52. Recommended by AIC for the analysis of quantification of gluten in food matrices. Registered laboratory for the analysis of food contact materials intended for export to Japan

Mod.PT01.01 Rev.4

3A Laboratori

LAB N° 1165

Test report n°: **15LA13582** of **09/11/2015**

Spett.
GHA Europe srl
Via Piemonte 7/1A
40069 Zola Predosa (BO)

Sample information

Test subject **Generic Material**

Description: **Treated sample - 25µm - Closed pore**

Registration date: **14/10/2015**

Date of arrival: **14/10/2015** Hour of arrival **11.30.00**

Date analysis commenced: **14/10/2015** Date analysis completed **22/10/2015**

Sampling data

Date: **12/10/2015**

Sample supplied by. **Client**

Transport. **Client**

Parameter *Method*	U M.	Result	LoQ
Determination of antibacterial activity (R) - R=(Ut-Uo)-(At-Uo) *ISO22196:2011*		**3,3**	0.6
Size of test specimens (H x L)	mm	**50x50**	
Thickness of test specimens	mm	**2,0**	
Type of polymer used for the cover film		**polypropylene**	
Size of the cover film (H x L)	mm	**40x40**	
Thickness of the cover film	mm	**0,10**	
Type of Gram negative strain		**Salmonella typhimurium ATCC**	
Volume of test inoculum	ml	**0,3**	
Number of viable bacteria in the test inoculum	n°	**400000**	
Uo - N° of viable bacteria recovered from the untreated test specimens after	log	**4,4**	1
Ut - N° of viable bacteria recovered from the untreated test specimens after 24	log	**3,3**	1
At - Count bacteria recovered from the treated samples 24 hours post	log	< 1.0	1

LEGEND U.M. = Unit of measurement; **(Sup)** = upper limit, **(Inf)** = Lower Limit x + y = acceptable range, **LoQ** = limit of quantification, the threshold value below which you choose not to bring any numerical result for the parameter in question. This limit is provided directly by the method, or is chosen on the basis of the experimental detection limits (LoQ or LoD) so as not to be changed over time or according to the chemical-physical or microbiological single sample. **LOD** = limit of detection **ND** = unquantifiable, indicates a value less than LoQ
"<x" or ">x" respectively indicate a value lower or higher than the measuring range of the test
UNLESS OTHERWISE SPECIFIED quantitative microbiological tests (excluding MPN) are performed on single replica and two consecutive dilutions in accordance with ISO 7218: 2013; the results of this test report are not correct for recovery factors (R) as the values of recovery are in the tolerance specified in the test method; summations are calculated using the criterion of the lower bound (LB)
The results marked in red indicate a exceeding the defined limits
If the sampling isn't the responsibility of 3ALaboratori Ltd the test results were obtained on the basis of the data declared

Note:
The product tested is considered effective when the antibacterial activity value is R >= 2.0 (as suggested by the standard JIS 2801:2010)

Technical Director

Dr Giovanni Mitaritonna
Chemist
Ordine Interprov. Chimici del Veneto - Padova n° 919 SEZ A

The analytical results are exclusively referred to the sample
Representation of a Test Report signed electronically in accordance with current legislation
The test report can not be reproduced in part without the written permission of the laboratory

Laboratory manager and system certified UNI EN ISO 9001:2008 by CSQA with the no. 1427/0 - included in the list of regional laboratories carrying out analysis in the context of self-control procedures for food industries No. 62 - Recommended by AIC for the analysis of quantification of gluten in food matrices - Registrated laboratory for the analysis of food contact materials regarded for export to Japan

Mod.PT01.01 Rev.4

3A Laboratori

LAB N° 1165

Test report n°: **15LA10382** of **09/11/2015**

Spett.
GHA Europe srl
Via Piemonte 7/1A
40069 Zola Predosa (BO)

Sample Information

Test subject: **Generic Material**

Description: **Treated sample - 25µm - Closed pore**

Registration date: **31/07/2015**

Date of arrival: **31/07/2015**

Date analysis commenced: **21/09/2015** Date analysis completed: **28/09/2015**

Sampling data

Date: **31/07/2015**

Sample supplied by: **Client**

Transport: **Client**

Parameter *Method*	U M	Result	LoQ
Determination of antibacterial activity (R) - R=(Ut-Uo)-(At-Uo) *ISO22196:2011*		**4,2**	0.6
Size of test specimens (H x L)	mm	**50x50**	
Thickness of test specimens	mm	**2,0**	
Type of polymer used for the cover film		**polypropylene**	
Size of the cover film (H x L)	mm	**40x40**	
Thickness of the cover film	mm	**0,10**	
Type of Gram-positive strain		**staphylococcus aureus - ATCC 2592**	
Volume of test inoculum	ml	**0,3**	
Number of viable bacteria in the test inoculum	n°	**140000**	
Uo - N° of viable bacteria recovered from the untreated test specimens after	log	**3,9**	1
Ut - N° of viable bacteria recovered from the untreated test specimens after 24	log	**4,3**	1
At - Count bacteria recovered from the treated samples 24 hours post	log	**< 1.0**	1

LEGEND: **U.M.** = Unit of measurement, **(Sup)** = upper limit, **(Inf)** = Lower Limit ; **x ÷ y** = acceptable range, **LoQ** = limit of quantification, the threshold value below which you choose not to bring any numerical result for the parameter in question; this limit is provided directly by the method, or is chosen on the basis of the experimental detection limits (LoQ or LoD) so as not to be changed over time or according to the chemical-physical or microbiological single sample. **LOD** = limit of detection; **NQ** = unquantifiable indicates a value less than LoQ

"**<x**" or "**>x**" respectively indicate a value lower or higher than the measuring range of the test

UNLESS OTHERWISE SPECIFIED: quantitative microbiological tests (excluding MPN) are performed on single replica and two consecutive dilutions in accordance with ISO 7218: 2013, the results of this test report are not correct for recovery factors (R) as the values of recovery are in the tolerance specified in the test method, summations are calculated using the criterion of the lower bound (LB)

The results marked in red indicate a exceeding the defined limits

If the sampling isn't the responsibility of 3ALaboratori Ltd, the test results were obtained on the basis of the data declared.

Note:

The product tested is considered effective when the antibacterial activity value is R >= 2.0 (as suggested by the standard JIS 2801:2010)

Technical Director

Dr. Giovanni Milantonna
Chemist
Ordine Interprov. Chimici del Veneto - Padova n° 610 SEZ. A

The analytical results are exclusively referred to the sample
Representation of a Test Report signed electronically in accordance with current legislation.
The test report can not be reproduced in part without the written permission of the laboratory

Laboratory management system certified UNI EN ISO 9001:2008 by CSQA with the No. 14270, inclusion in the list of regional laboratories carrying out analysis in the context of self-control procedures for Food Industries No. 52. Recommended by AIC for the analysis of quantification of gluten in food matrices. Registered laboratory for the analysis of food contact materials intended for export to Japan

Mod PT01.01 Rev.4

3A-Laboratori SRL
Via A Volta 1/d Mosarù di Padova 35020 (PD) Email amministrazione1@3alaboratori.it Tel. 049 9924666-9194671 Fax 049 8666430
Cap. Soc. €100000,00 I.V. REA di PD 378402 Codice Fiscale Iscriz. Reg. Imprese di Padova e Partita Iva 04295730200

3A Laboratori

LAB N° 1165

Test report n°: **15LA10383** of **09/11/2015**

Spett.
GHA Europe srl
Via Piemonte 7/1A
40069 Zola Predosa (BO)

Sample Information

Test subject: **Generic Material**

Description: **Treated sample - 25µm - Closed pore**

Registration date: **31/07/2015**

Date of arrival: **31/07/2015**

Date analysis commenced: **21/09/2015** Date analysis completed: **28/09/2015**

Sampling data

Date: **31/07/2015**

Sample supplied by: **Client**

Transport: **Client**

Parameter *Method*	U.M.	Result	LoQ
Determination of antibacterial activity (R) - R=(Ut-Uo)-(At-Uo) *M1 30534 Rev0 2015 in similitudine alla ISO22196:2011*		**3,1**	**0.6**
Size of test specimens (H x L)	mm	**50x50**	
Thickness of test specimens	mm	**2,0**	
Type of polymer used for the cover film		**polypropylene**	
Size of the cover film (H x L)	mm	**40x40**	
Thickness of the cover film	mm	**0,10**	
Type of Gram-negative strain		**Candida albicans ATCC 10231**	
Volume of test inoculum	ml	**0,3**	
Number of viable bacteria in the test inoculum	n°	**20000**	
Uo - N° of viable bacteria recovered from the untreated test specimens after	log	**3,1**	**1**
Ut - N° of viable bacteria recovered from the untreated ttest specimens after 24	log	**3,1**	**1**
At - Count bacteria recovered from the treated samples: 24 hours post	log	**< 1.0**	**1**

LEGEND: **U.M.** = Unit of measurement (Sup) = upper limit, (inf) = Lower Limit ; x ÷ y = acceptable range; **LoQ** = limit of quantification: the threshold value below which you choose not to bring any numerical result for the parameter in question; this limit is provided directly by the method or is chosen on the basis of the experimental detection limits (LoQ or LoD) so as not to be charged over time or according to the chemical-physical or microbiological anglis sample. **LOD** = limit of detection; **NQ** = unquantifiable, indicates a value less than LoQ
"<x" or ">x" respectively indicate a value lower or higher than the measuring range of the test
UNLESS OTHERWISE SPECIFIED quantitative microbiological tests (excluding MPN) are performed on single replica and two consecutive dilutions in accordance with ISO 7218: 2013; the results of this test report are not correct for recovery factors (R) as the values of recovery are in the tolerance specified in the test method. summations are calculated using the criterion of the lower bound (LB)
The results marked in red indicate a exceeding the defined limits
If the sampling isn't the responsibility of 3ALaboratori Ltd., the test results were obtained on the basis of the data declared

Note:
The product tested is considered effective when the antibacterial activity value is R >= 2.0 (as suggested by the standard JIS 2801:2010)

Technical Director

Dr. Giovanni Minantonina
Chemist
Ordine Interpov. Chimici del Veneto - Padova n° 910 SEZ. A

The analytical results are exclusively referred to the sample.
Representation of a Test Report signed electronically in accordance with current legislation.
The test report can not be reproduced in part without the written permission of the laboratory

Laboratory management system certified UNI EN ISO 9001:2008 by DSQA with the No. 1827/0. Inclusion in the list of regional laboratories carrying out analysis in the control of self-seven processes As Cyto-mutagenes No. 5/. Recommended by AIC for the analysis of quantification of gluten in low matrices. Registered laboratory for the analysis of food contact materials intended for export in Japan

Mod.PT01.01 Rev.4

3A Laboratori

ACCREDIA

LAB N° 1165

Test report n°: **15LA13580 of 09/11/2015**

Spett.
GHA Europe srl
Via Piemonte 7/1A
40069 Zola Predosa (BO)

Sample Information

Test subject: **Generic Material**

Description: **Treated sample - 25µm - Closed pore**

Registration date. **14/10/2015**

Date of arrival: **14/10/2015** Hour of arrival **11.30.00**

Date analysis commenced. **21/10/2015** Date analysis completed. **02/11/2015**

Sampling data

Date: **12/10/2015**

Sample supplied by **Client**

Transport: **Client**

Parameter *Method*	U.M.	Result	LoQ
Determination of antibacterial activity (R) - R=(Ut-Uo)-(At-Uo) *M I 3053A Rev0 2015 in similitudine alla ISO22196:2011*		**2,9**	0 6
Size of test specimens (H x L)	mm	**50x50**	
Thickness of test specimens	mm	**2,0**	
Type of polymer used for the cover film		**polypropylene**	
Size of the cover film (H x L)	mm	**40x40**	
Thickness of the cover film	mm	**0,10**	
Type of Gram-negative strain		**LegionellaPneumophila ATCC**	
Volume of test inoculum	ml	**0,3**	
Number of viable bacteria in the test inoculum	n°	**61000**	
Uo - N° of viable bacteria recovered from the untreated test specimens after	log	**3,6**	1
Ut - N° of viable bacteria recovered from the untreated test specimens after 24	log	**2,9**	1
At - Count bacteria recovered from the treated samples 24 hours post	log	**< 1.0**	1

LEGEND. **U.M.** = Unit of measurement; **(Sup)** = upper limit; **(Inf)** = Lower Limit ,; **x + y** = acceptable range; **LoQ** = limit of quantification, the threshold value below which you choose not to bring any numerical result for the parameter in question; this limit is provided directly by the method, or is chosen on the basis of the experimental detection limits (LoQ or LoD) so as not to be changed over time or according to the chemical-physical or microbiological single sample; **LOD** = limit of detection. **NQ** = unquantifiable indicates a value less than LoQ

"<x" or ">x" respectively indicate a value lower or higher than the measuring range of the test

UNLESS OTHERWISE SPECIFIED quantitative microbiological tests (excluding MPN) are performed on single replica and two consecutive solutions in accordance with ISO 7218: 2013, the results of this test report are not correct for recovery factors (R) as the values of recovery are in the tolerance specified in the test method, summations are calculated using the criterion of the lower bound (LB)

The results marked in red indicate a exceeding the defined limits.

If the sampling isn't the responsibility of 3ALaboratori Ltd , the test results were obtained on the basis of the data declared

Note:
The product tested is considered effective when the antibacterial activity value is R >= 2.0 (as suggested by the standard JIS 2801.2010)

Technical Director

Dr. Giovanna Mitaritonna
Chemist
Ordine Interprov. Chimici del Veneto - Padova n° 910 SEZ. A

The analytical results are exclusively referred to the sample.
Representation of a Test Report signed electronically in accordance with current legislation.
The test report can not be reproduced in part without the written permission of the laboratory

Laboratory management system certified UNI EN ISO 9001 2008 by CSQA with the No. 14270. Inclusion in the list of regional laboratories carrying out analysis in the context of self-control procedures for Food industries for 52. Recommended by AIC for the analysis of quantification of gluten in food industry. Registered laboratory for the analysis of food contact materials intended for export to Japan

Mod.PT01 01 Rev 4

3A-Laboratori SRL
Via A Volta 1/d Masera di Padova - 35020 (PD) E-mail amministrazione@3alaboratori.it Tel. 049 8964658-8964671 Fax 049 8868430
Cap. Soc. 610000 EUR I.V. REA di PD 375462 Codice Fiscale, Iscriz. Reg. Imprese di Padova e Partita Iva 04296730285