



in collaborazione con  
prof. P.G.Balboni Università degli Studi di  
Ferrara\_Microbiologia

S/15/0060
Rev. 0
Challenge test
Pag. 1 di 7 / Page 1 out of 7

## REPORT CHALLENGE TEST METODO FARMACOPEA EUROPEA 8.0

COD. LAB.: 150138\_5

Redazione certificato di analisi: 23/02/2015  
Drafting certificate of Analysis: 2015/02/23

---

Valutazione “*in vitro*” della stabilità microbiologica in base al metodo Farmacopea Europea 8.0 (Ed. 2014) Tabella 5.1.3-3 per preparazioni ad uso topico.

*According the European Pharmacopeia 8.0 (Ed. 2014) the evaluation of antimicrobial preservation. TABLE 5.1.3-3 for preparations for skin (for topical use).*

PRODOTTO /PRODUCT

**LINEA CORPO CREMA GAMBE RILASSANTE 100 ml**

**COMMITTENTE / CUSTOMER:**

**UNIPRO SERVIZI S.r.l.**

Via Accademia, 33  
20131 MILANO

**SPONSOR**

**SOLALE S.r.l.**

Via Achille Grandi, 4  
20015 Parabiago Milano - Italy

Data ricevimento campione / *Reception date*: 13/01/2015

Periodo di analisi: *Period of analysis*:

Data inizio analisi / *Date of testing*: 20/01/2015

Data fine analisi / *End Date test*: 18/02/2015

Pag. 1 di 7 / Page 1 out of 7

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

S/15/0060
Rev. 0
Challenge test
Pag. 2 di 7 / Page 2 out of 7

## **CHALLENGE TEST: METODO DELL'EFFICACIA PRESERVANTE FARMACOPEA EUROPEA Ed. 8.0**

### **1-SCOPO DEL TEST**

Verificare nel tempo la stabilità microbiologica di preparazioni destinate ad applicazione cutanea (stoccaggio e uso).

Il test prevede la contaminazione del prodotto con microrganismi di diversa specie e la successiva valutazione della variazione di carica microbica mediante il conteggio in piastra del numero dei germi vivi ad intervalli di tempo regolari per un periodo di 28 giorni.

La capacità di difesa di un prodotto per applicazione cutanea dall'aggressione microbica viene verificata in base all'osservazione della riduzione di carica microbica (per ciascuna specie) entro un certo intervallo di tempo, secondo i criteri di accettabilità emanati da Farmacopea Europea 8.0 (Ed.2014).

La valutazione complessiva della protezione antimicrobica comprende:

- le caratteristiche chimiche del sistema conservante;
- le caratteristiche della formulazione;
- il design del packaging;
- il processo di fabbricazione (norme GMP).

Materiali e metodo del Challenge test per valutare l'efficacia del sistema preservante è eseguito secondo la Farmacopea Europea 8.0.

**Microrganismi utilizzati ATCC / ATCC microorganisms for antibacterial testing:**

*Staphylococcus aureus* ATCC\* 6538 (Gram+/ Bacteria Gram positive)  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC\* 9027 (Gram- / Bacteria Gram negative)  
*Escherichia coli* ATCC\*8739 (Gram- / Bacteria Gram negative)  
*Candida albicans* ATCC\*10231 (Lievito / Yeast)  
*Aspergillus brasiliensis* ATCC\*16404 (Muffa/ Molds)

**\*ATCC (American Type Collection Control)**

## **PRESERVATIVE EFFICACY METHOD EUROPEAN PHARMACOPEIA 8.0**

### **1-PURPOSE OF THE TEST**

*Checking the microbiological stability of the preparations for cutaneous application (storage and use) over time.*

*The test is includes by contaminating the product with microorganisms from several species, and by subsequently assessing the change in the microbial load by plate counting the number of microorganisms living at regular time intervals for a period of 28 days. The capacity against microbial attack of the mucosal preparation is verified based on the observation of the reduction of the microbial load (for each species) within a given time span, according to the criteria of acceptability emanated by European pharmacopoeia, published Council of Europe, published in accordance with the convention on the elaboration of a European Pharmacopoeia 8.0 (Ed. 2014).*

*This evaluation of the antimicrobial protection comprises:*

- chemical preservation;*
- Inherent characteristics of the formulation:*
- package design;*
- manufacturing process (GMP).*

*Materials and method Challenge test to evaluate the effectiveness of the preservative is performed according to European Pharmacopoeia 8.0.*

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

S/15/0060
Rev. 0
Challenge test
Pag. 3 di 7 / Page 3 out of 7

La concentrazione dell'inoculo (tempo zero : T<sub>0</sub>) :

Batteri: 10<sup>6</sup> ufc/g;  
 Miceti: 10<sup>5</sup> ufc/g.  
 ufc/g: unità formante colonia [microrganismi vitali] /  
 grammo (g) di prodotto.

**Tempo di verifica del Challenge test**

Il tempo di verifica per ogni campione e per ogni ceppo standard corrisponde al momento dell'inoculazione del microrganismo (tempo 0=T<sub>0</sub>) e dopo 2, 7, 14 e 28 giorni, per verificare l'abbattimento totale dell'inoculo iniziale.

*Inoculum concentration at T<sub>0</sub>:*

*The inoculum concentration (Time 0: T<sub>0</sub>):  
 For bacteria : the bacterial inoculum of 10<sup>6</sup> cfu/g;  
 For fungi (Yeasts and Molds) :  
 the fungal inoculum of 10<sup>5</sup> cfu/g.  
 cfu/g: colony-forming units [count viable total]/  
 gramm (g) of the product.*

*Evaluation of test time*

*The total incubation time of the sample is 28 days and the controls for the verification of the possible reduction of microorganisms by the preserving system are performed after 2, 7, 14 and 28 days from the inoculation.*

**3-CRITERI DI ACCETTABILITÀ: CRITERIO per preparazioni per applicazioni cutanee (ad uso topico) .  
 TABELLA 5.1.3-3**

Il metodo prevede i seguenti criteri per la valutazione dell'efficacia del sistema di conservazione:

**3-ACCEPTANCE CRITERIA: CRITERION for preparations for cutaneous application. TABLE 5.1.3-3**

*The method provides the following criteria for the evaluation of the efficacy of the preserving system:*

Microorganisms:	Log reduction value (R <sub>x</sub> = log N <sub>0</sub> -Log N <sub>x</sub> ) required <sup>a</sup>				Limit of acceptability European Pharmacopeia 8.0
	After 2 days	After 7 days	After 14 days	After 28 days	
BACTERIA	-	-	3	N <sup>b</sup>	ACCEPTABLE
FUNGI: Candida albicans / Aspergillus brasiliensis	-	-	1	N <sup>b</sup>	ACCEPTABLE

a: in this test, on acceptable range of deviation of 0÷6 log is accepted

b: NI no increase in the count from the previous contact time

R:Reduction / Riduzione

N<sub>0</sub>= number of microorganisms inoculated at time T<sub>0</sub> N<sub>x</sub>= number of surviving microorganisms at each sampling time T<sub>x</sub>

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

S/15/0060
Rev. 0
Challenge test
Pag. 4 di 7 / Page 4 out of 7

## CONVALIDA DEL METODO:

*Tryptic Soy Agar* per i batteri:

TS AGAR + INATTIVANTI – VWR INTERNATIONAL PBI - LOT. 092614031 EXP. 2015/06/23

SAB+CAF: Sabouraud agar+CAF per i miceti

SD+CL AGAR – VWR INTERNATIONAL PBI – LOT. 072814002 EXP. 2015/04/24.

### QUALITY CONTROL:

*Sterility Test: incubation 48 hours at 37°C and 48 hours at 25°C: no growth.*

*RESULT: Satisfactory*

*Fertility Test (Microbiological quality criteria according to European Pharmacopoeia): aerobiosis incubation 48 hours at 37°C. Reading at 18-72 hours: growth.*

*RESULT: Satisfactory*

Diluente: *Ringer solution.*

Soluzione neutralizzante: *Eugon LT 100 liquid broth.*

### Quality control:

*Sterility Test: incubation 48 hours at 37°C and 48 hours at 25°C: no growth.*

*RESULT: Satisfactory*

## CONVALIDA DEL METODO DI NEUTRALIZZAZIONE:

Efficacia del neutralizzante e non tossicità del neutralizzante: CONFORME.

*Validation of the method of neutralization:*

*Effectiveness of neutralizing and non-neutralizing toxicity.*

*RESULT: Satisfactory.*

Pag. 4 di 7 / Page 4 out of 7

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

S/15/0060
Rev. 0
Challenge test
Pag. 5 di 7 / Page 5 out of 7

**CERTIFICATO DI ANALISI: Certificate of analysis:**  
**CHALLENGE TEST European Pharmacopoeia 8.0**

PRODOTTO / *PRODUCT*:

**LINEA CORPO CREMA GAMBE RILASSANTE 100 ml**  
**SOLALE S.r.l.**

Data ricevimento campione / *Reception date*: 13/01/2015

Periodo di analisi: *Period of analysis*:

Data inizio analisi / *Date of testing*: 20/01/2015

Data fine analisi / *End Date test*: 18/02/2015

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

<b>Microrganismi/ <i>Microorganisms test</i></b>	<b>T<sub>0</sub></b>	<b>T<sub>2 gg.</sub></b>	<b>T<sub>7 gg.</sub></b>	<b>T<sub>14 gg.</sub></b>	<b>T<sub>28 gg.</sub></b>
	<i>inoculum</i>				
<b><i>Stafilococcus aureus</i></b> ATCC 6538	1,8x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	<10	<10	<10
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> ATCC 9027	2,0x10 <sup>6</sup>	<10	<10	<10	<10
<b><i>Escherichia coli</i></b> ATCC 8739	1,9x10 <sup>6</sup>	<10	<10	<10	<10
<b><i>Candida albicans</i></b> ATCC 10231	1,5x10 <sup>5</sup>	<10	<10	<10	<10
<b><i>Aspergillus brasiliensis</i></b> ATCC 16404	1,2x10 <sup>5</sup>	<10	<10	<10	<10

I dati espressi in unità formanti colonia (ufc)/g / *The data express in the colony forming units [cfu] /g*

T= intervallo di tempo di analisi. / *T= time of analysis.*

TVC= Conta totale prima dell'esecuzione del Challenge test= <10 cfu/gr. /

*Total Vital Count before the execution of the test.=<10 cfu/g.*

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

<b>Microrganismi test/ <i>Microorganisms test</i></b>	<b>RIDUZIONE LOG / LOG REDUCTION</b>				<b><i>Criterio di Accettabilità</i></b>
	<b>T<sub>2gg.</sub></b>	<b>T<sub>7gg.</sub></b>	<b>T<sub>14gg.</sub></b>	<b>T<sub>28gg.</sub></b>	
<b><i>Stafilococcus aureus</i></b> ATCC 6538	≥ 3 Log	6 Log	NI	NI	ACCETTABILE / ACCEPTABLE
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> ATCC 9027	≥ 6 Log	NI	NI	NI	ACCETTABILE / ACCEPTABLE
<b><i>Escherichia coli</i></b> ATCC 8739	≥ 6 Log	NI	NI	NI	ACCETTABILE / ACCEPTABLE
<b><i>Candida albicans</i></b> ATCC 10231	≥ 5 Log	NI	NI	NI	ACCETTABILE / ACCEPTABLE
<b><i>Aspergillus brasiliensis</i></b> ATCC 16404	≥ 5 Log	NI	NI	NI	ACCETTABILE / ACCEPTABLE

I dati esprimono la riduzione microbica in LOG in funzione del tempo. (NI=nessun incremento) /

*The data express the LOG reduction of inoculated germs relative to established control intervals. (NI: No Increase).*

Pag. 5 di 7 / Page 5 out of 7

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.*

**GRAFICO/GRAPH:**

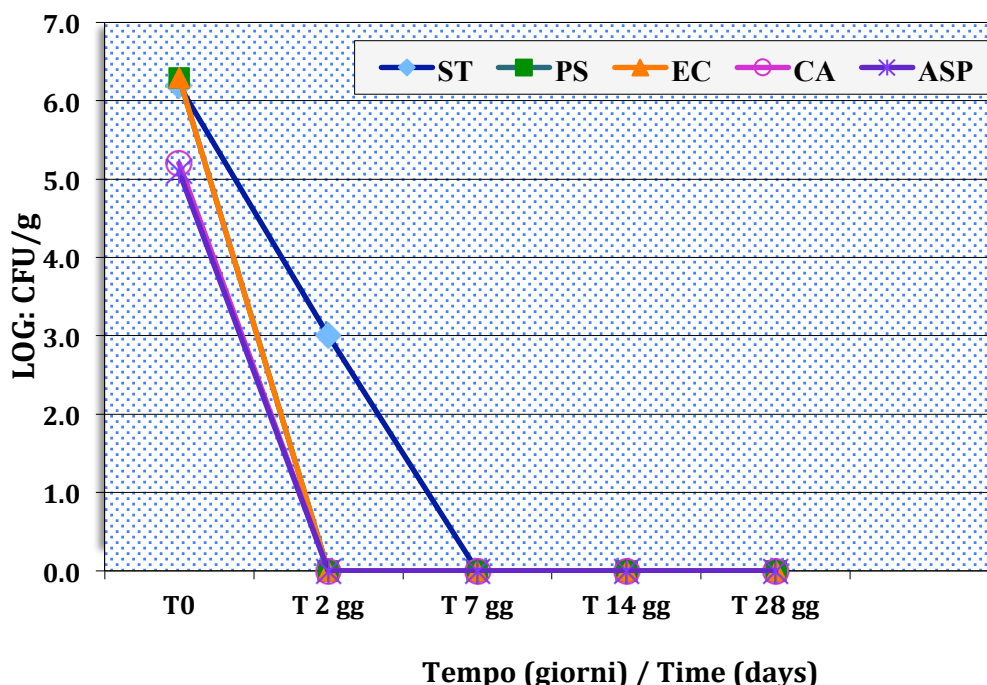
Nel grafico è riportato la variazione logaritmica della carica microbica rispetto alla carica microbica iniziale (inoculum) in funzione del tempo. /

*The graph shows the logarithmic variation of the microbial load in the inoculated sample in function of time.*

**PRODOTTO / PRODUCT:**

**LINEA CORPO CREMA GAMBE RILASSANTE 100 ml**

**SOLALE S.r.l.**



**LEGENDA / EXPLANATION:**

**CFU/g:** unità formanti colonia relative ad 1 grammo (g) di campione analizzato /  
*colony forming units relative to 1 gram (g) of product.*

**Tempo di esecuzione (giorni) / T= time of analysis (days).**

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

S/15/0060
Rev. 0
Challenge test
Pag. 7 di 7 / Page 7 out of 7

## CONCLUSIONI / CONCLUSIONS

Il sistema preservante, secondo i criteri di valutazione raccomandati dal metodo della Farmacopea Europea 8.0 (Rif. 01/2014:50103), dei prodotti per applicazione cutanea risultano **ACCETTABILI**: il rischio microbiologico è accettabile /

*According to the assessment criteria recommended by the European Pharmacopoeia 8.0 (Ref. 01/2014:50103), the preservative system of the test products for cutaneous applications are **ACCEPTABLE**: the microbiological risk is acceptable:*

---

### LINEA CORPO CREMA GAMBE RILASSANTE 100 ml SOLALE S.r.l.

è conforme al criterio A: il rischio microbiologico è **ACCETTABILE**: il prodotto è considerato protetto contro la proliferazione microbica e non è necessario considerare altri fattori che sono indipendenti dalla formulazione.

*in conforming to the criterion A: microbiological risk is **ACCEPTABLE**: the product is considered to be protected against microbial proliferation and it is not necessary to consider other factors that are independent of the formulation.*

---

Redazione certificato di analisi: 23/02/2015

Drafting certificate of Analysis: 2015/02/23

---

(Responsabile scientifico Firma / Signature  
Prof Pier Giorgio Balboni)  
UNIVERSITY OF FERRARA  
Prof. cultore della materia "Microbiologia" presso  
D.to Sc. Mediche

Pag. 7 di 7 / Page 7 out of 7

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.*