



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA / *UNIVERSITY OF FERRARA*
DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE E DIAGNOSTICA / *DPT. EXP. & DIAGNOSTIC MEDICINE*
SEZIONE DI MICROBIOLOGIA / *SECTION OF MICROBIOLOGY*
via LUIGI BORSARI, 46 – 44100 FERRARA - ITALY

REPORT European standard UNI EN 14476:2007

Valutazione dell'efficacia virucida del prodotto: /
Evaluation of the virucidal efficacy of a product:

<< KILL PLUS NETTUNO >>
LOTTO 131109

“Prova quantitativa in sospensione virucida per disinfettanti chimici ed antisettici”
UNI EN 14476:2007 (Fase 2 – Stadio 1)

“The virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics”
UNI EN 14476:2007 (Phase 2 /Step 1).

COMMITTENTE / CUSTOMER:

NETTUNO SRL

Viale Industria, 16/18
24060 Caselli Calepio (BG)

Ferrara, 16 december 2009
Ferrara: december 16th 2009

Prodotto / Product: << KILL PLUS NETTUNO>>**Lotto 131109****COMMITTENTE / CUSTOMER:****NETTUNO SRL**

Viale Industria, 16/18

24060 Caselli Calepio (BG)

INDICE / CONTENTS:

INTRODUZIONE / FOREWORD	pag./ page	3
1 - TERMINI E DEFINIZIONI / TERMS AND DEFINITIONS	pag./ page	4
2 - CARATTERIZZAZIONE DEL PRODOTTO / PRODUCT IDENTITY	pag./ page	5
Valutazione dell'efficacia virucida / Evaluation of the virucidal efficacy.		
Prova quantitativa in sospensione virucida per disinfettanti e antisettici – Metodi di prova e requisiti della Norma UNI EN 14476: 2007 (Fase 2 – stadio 1) /		
Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectant and antiseptics – Test method and requirements European Standard EN 14476:2007(Phase 2- Step 1):		
3-PROCEDURA SPERIMENTALE / EXPERIMENTAL PROCEDURE	pag./ page	6
3.1 – MATERIALI E REAGENT / MATERIAL AND REAGENT	pag./ page	6
3.1.1 VIRUS TEST / TEST VIRUS	pag./ page	6
3.1.2 TERRENI DI COLTURA E REAGENT / CULTURE MEDIA AND REAGENTS	pag./ page	6
3.1.3 SOSTANZE INTERFERENTI / INTERFERING SUBSTANCES	pag./ page	7
3.1.4 APPARECCHIATURE /USUAL MICROBIOLOGICAL LABORATORY EQUIPMENT	pag./ page	8
4 – CONDIZIONI SPERIMENTALI / EXPERIMENTAL CONDITIONS	pag./ page	9
5 – METODO DI PROVA / TEST METHOD	pag./ page	10
5.1 – PROVE PRELIMINARI / PRELIMINARY TEST	pag./ page	10
5.2 – TEST VIRUCIDA: SAGGIO VERO E PROPRIO / VIRUCIDAL TESTING	pag./ page	10
5.3 – TEST DI SENSIBILITÀ CELLULARE AL VIRUS / CELL SENSITIVITY TO VIRUS	pag./ page	11
5.4 – CONTROLLO INATTIVAZIONE / REFERENCE VIRUS INACTIVATION TEST	pag./ page	12
5.5 – CITOTOSSICITÀ / CYTOTOXICITY	pag./ page	12
6 – CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI / CALCULATION AND EXPRESSION OF RESULTS	pag./ page	13
7 – VERIFICA DEL METODO / VERIFICATION OF THE METHODOLOGY	pag./ page	13
8 – RISULTATI / RESULTS	pag./ page	14
8.1 – VALIDAZIONE / VALIDATION OF TEST RESULTS	pag./ page	14
8.2 – TABELLA: ATTIVITÀ VIRUCIDA / TABLE : VIRUCIDAL ACTIVITY	pag./ page	15
8.2.1 – TABELLA 1 / TABLE 1:	pag./ page	15
8.2.1 – TABELLA 2 / TABLE 2:	pag./ page	16
8.2.1 – TABELLA 3 / TABLE 3	pag./ page	17
9 – CONCLUSIONI / CONCLUSIONS	pag./ page	18
10 – APPENDICE / ANNEX	pag./ page	19
10.1- APPENDICE 1 / ANNEX 1	pag./ page	19

INTRODUZIONE / FOREWORD

Valutazione dell'efficacia virucida / Evaluation of the virucidal efficacy.

Prova quantitativa in sospensione virucida per disinfettanti e antisettici – Metodi di prova e requisiti della Norma UNI EN 14476: 2007 (Fase 2 – stadio 1) /

Questa norma europea standard specifica il metodo di prova e i requisiti minimi per valutare l'efficacia di prodotti chimici disinfettanti e antisettici utilizzati in campo medico. /

Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectant and antiseptics – Test method and requirements European Standard EN 14476:2007(Phase 2- Step 1):

This European standard specifies test method and minimum requirements to evaluate the efficacy of chemical disinfectants and antiseptics for different applications in the medical field.

L'efficacia virucida del prodotto in esame " **KILL PLUS NETTUNO** " **LOTTO 131109** è stata esaminata nei confronti dei virus *Parvovirus, Adenovirus, Poliovirus e Herpes simplex type 1* in base al metodo di prova in sospensione della Norma Europea Standard UNI EN 14476:2007. Il prodotto in esame viene analizzato in base a precise e definite condizioni sperimentali, comprendenti la temperatura, il tempo di contatto e le sostanze interferenti, per dimostrare una riduzione di almeno 4 logaritmi del titolo virale del ceppo virale in esame.

The virucidal efficacy of " KILL PLUS NETTUNO " LOTTO 131109 was tested against virus Parvovirus, Adenovirus , Poliovirus and Herpes simplex virus type 1 in a suspension test following to the European Standard UNI EN 14476:2007. Under this standard, the test product is tested against the viruses under defined test conditions, including temperature, contact time, and interfering substances, and the product should demonstrate at least a four log reduction in the titre of the test strain.

1 - TERMINI E DEFINIZIONI / TERMS AND DEFINITIONS

In questo documento sono presenti i seguenti termini e relative definizioni / *For the method of this document, the following definitions apply:*

Condizioni di pulizia: condizioni delle superfici sottoposte al procedimento di pulizia sulle quali sono presenti livelli minimi di sostanze organiche e/o inorganiche. / **Clean conditions:** *conditions representative of surfaces which have received a satisfactory cleaning programme and/or known to contain minimal levels of organic and/or inorganic substances.*

Condizioni di sporco: condizioni significative di sporco comprendente sostanze organiche e/o inorganiche delle superfici sottoposte a disinfezione o a un trattamento antisettico. / **Dirty conditions:** *conditions representative of surfaces which have known to or may contain organic and/or inorganic substances.*

Citotossicità: alterazione morfologica delle cellule e/o la loro distruzione o una loro ridotta sensibilità nei confronti della moltiplicazione virale causata dal prodotto. / **Cytotoxicity:** *morphological alteration of cells and/or destruction or their reduced sensitivity to virus multiplication caused by the product.*

Inattivazione dei virus: riduzione dell'infettività di un virus nei confronti del prodotto in esame. / **Inactivation of viruses:** *reduction of infectivity of a virus by the product.*

Sostanze interferenti: soluzioni proteiche e eritrociti che sono aggiunti ad una sospensione virale prima di aggiungere alla soluzione del prodotto in prova per dimostrare qualche influenza delle proteine e degli eritrociti sull'attività virucida della soluzione del prodotto test.

Interfering substances: *protein solutions and erythrocytes that are added to a test virus suspension before addition of the product test solution to demonstrate any influence of protein and erythrocytes on the virucidal activity of the product test solution.*

Unità Formanti Placche (PFU): numero di particelle virali infettanti per unità di volume (ml).

Plaque forming units (PFU): *number of infectious virus particles per unit volume (ml).*

Test di riferimento di attivazione virale (controllo positivo): test effettuato in parallelo con il prodotto test utilizzando un prodotto ad attività virucida ad esempio la formaldeide.

Reference virus inactivation test: *test with a defined virucidal product (e.g. formaldehyde) in parallel with a product under test for the internal control of the test.*

ID₅₀: dose infettante il 50% di sospensione virale o della diluizione della sospensione virale che induce nelle colture cellulare il 50% di effetto citotossico virale (CPE).

ID₅₀: *50% infecting dose of a virus suspension or that dilution of the virus suspension that induce a CPE in 50% of cell culture units.*

Effetto citotossico virale (CPE): alterazione morfologica delle cellule e/o la loro distruzione conseguente alla moltiplicazione del virus. / **Viral cytopathic effect (CPE):** *morphological alteration of cells and/or destruction as a consequence of virus multiplication.*

Attività virucida o antivirale: capacità di un prodotto di produrre una riduzione del numero di particelle virali infettanti tramite procedure sperimentali che comprendono precise e definite condizioni di prova. / **Virucidal activity:** **capability of a product to produce a reduction in the number of infectious virus particles of relevant test organisms under defined conditions.**

Titolo virale: equivalente del virus infettante per unità di volume presente in una coltura cellulare dopo lisi. / **Virus titre:** *amount of infectious virus per unit volume present in a cell culture lysate.*

2-CARATTERIZZAZIONE DEL PRODOTTO / PRODUCT IDENTITY:

1. Nome del prodotto in esame / Name of the test product: “ KILL PLUS NETTUNO “

LOTTO 131109”

Stoccaggio / Storage condition: Room Temperature

Concentrazione di utilizzo / Product ready to use.

Produttore / Manufacturer:

NETTUNO SRL

Viale Industria, 16/18

24060 Caselli Calepio (BG)

2. Periodo test / Period of testing:

Date / Dates of test: 27 nov 2009 ÷ 16 dic 2009 / 2009-11-27 ÷ 2009-12-16.

3. Condizioni sperimentali / Experimental conditions

Concentrazione del prodotto / product concentration:

Prodotto diluito: concentrazione del prodotto in esame: 100%.

Product diluted: concentration of the product tested: 100%.

Diluente /Diluent: Acqua dura /Hard water.

Condizioni obbligatorie / Obligatory test conditions:

Temperatura test / Test temperature: 20 °C;

Tempo di contatto / Contact time:

- 5 min.

Virus in esame / Test virus:

- **Parvovirus Bovine, ceppo Haden, ATCC VR - 767**
- **Poliovirus type 1** (gruppo Picornavirus - RNA virus), **ceppo LSc - 2ab**
- **Adenovirus type 5** (gruppo Adenovirus - DNA virus), **ceppo Adenoid 75, ATCC VR – 5**
- **Herpes simplex virus type 1**

3 - PROCEDURA SPERIMENTALE / EXPERIMENTAL PROCEDURE

3.1 - MATERIALI E REAGENTI / MATERIAL AND REAGENTS:

3.1.1 - VIRUS TEST/ TEST VIRUSES

L'efficacia virucida è stata valutata nei confronti del virus test: /

The virucidal efficacy shall be evaluated using the following test virus:

- **Parvovirus Bovine**, ceppo Haden, ATCC VR - 767
- **Poliovirus type 1** (gruppo Picornavirus - RNA virus), ceppo LSc - 2ab
- **Adenovirus type 5** (gruppo Adenovirus - DNA virus), ceppo Adenoid 75, ATCC VR – 5
- **Herpes simplex virus type 1**

La sospensione virale di un virus è ottenuta da collezioni standard internazionale: American Type Culture Collection (ATCC) – 10801 University Blvd- Manassas, VA 20110-2209 (LGC Promochem).

The stock virus suspensions is obtained from international standard collections: American Type Culture Collection (ATCC) – 10801 University Blvd- Manassas, VA 20110-2209 (LGC Promochem).

Sospensione stock virale / Stock virus suspension:

Ogni sospensione virale è preparata e ampliata su larga scala in base alle caratteristiche di crescita in colture cellulari del virus stesso. Si prepara uno stock di sospensione virale comprendente la titolazione del virus, il quale successivamente viene suddiviso in aliquote a titolo noto di 2 ml di volume in eppendorf e conservato alla temperatura inferiore a -70°C o preferibilmente a -196°C in azoto./

Stock virus suspensions are prepared from reference virus suspensions.

The virus has to be multiplied on a large scale to obtain a virus suspension of the same characteristic as the reference virus suspension.

The virus suspension is kept in small volumes (2 ml) below -70°C or preferably at – 196°C under nitrogen.

3.1.2 - TERRENI DI CULTURA E REAGENTI / CULTURE MEDIA AND REAGENTS

3.1.2.1 - Acqua distillata:/Water:

L'acqua distillata ottenuta da un procedimento di osmosi inversa microbiologicamente pura e libera da sostanze tossiche per le cellule.

The water shall be free from substances that are toxic or inhibiting to viruses and not cytotoxic for the cell culture. It shall be freshly glass distilled and not demineralized water. Sterilise by autoclave.

3.1.2.2 - Acqua dura / Hard water for dilution of the products:

L'acqua dura è costituita da / *Hard water for dilution of products shall be prepared as follows :*

Soluzione A: / *-Solution A* dissolve 19,84 g anhydrous MgCl₂ and 46,24 g anhydrous CaCl₂ in water and dilute to 1000 ml.

MgCl ₂ anidro	19,84 g	MERCK
CaCl ₂	46,24 g	MERCK
Acqua distillata	1000 ml	

-Soluzione B: / -Solution B: dissolve 35,02 g NaHCO₃ in water and dilute to 1000 ml.

NaHCO ₃	35,02 g	MERCK
Acqua distillata	1000 ml	

Addizionare 6,0 ml di soluzione A e 8,0 ml di soluzione B e portare a volume a 100 ml con acqua distillata sterile. Controllare il pH della soluzione finale a $7,0 \pm 0,2$. Sterilizzare per filtrazione con membrane filtro con pori di diametro di 0,22 μm . / *Add 6,0 ml of solution A in a 1000 ml volumetric flask and add 8,0 ml solution B in water and dilute to 1 000 ml. After adjustment, the pH of the solution shall be $7,0 \pm 0,2$ before use. Sterilise by passing through a filter with a maximum effective pore size of 0,22 μm .*

3.1.2.3 - Terreno di coltura delle colture cellulari/ Culture medium

Dulbecco modificato (D-MEM) (BioWitthaker Europe) addizionate con il 10% di siero fetale bovino (SFB), l'1% di L - glutammina e l'1% di penicillina - streptomina (pen - strep). /

Dulbecco Minimum Essential Medium (D-MEM-BioWitthaker Europe) supplemented with appropriate concentration of inactivated and mycoplasma-free foetal calf serum (FCS) 10%, L - glutamyn 1% and antibiotics penicillin - streptomycin (pen - strep) 1%.

3.1.2.4 - Soluzioni per colture cellulari:/ Phosphate Buffered Saline for cell cultures:

Soluzione PBS salina Tris-buffer (TBS) (25 mM Tris): si sciolgono 8 g di NaCl, 0,2 g di KCl, 3 g di Tris base in 800 ml di H₂O distillata. Si porta a pH 7,4 \pm 0,2 aggiungendo HCl. Si aggiunge H₂O distillata fino ad 1 litro. La soluzione viene suddivisa in aliquote e sterilizzata in autoclave a 121°C per 20 - 30 min. Si conserva a temperatura ambiente. /

The Phosphate Buffered Saline PBS is Tris-buffer (TBS) (25 mM Tris): dissolve 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3 g Tris in water and dilute to 1000 ml.

After adjustment, the pH of the solution shall be $7,4 \pm 0,2$ before use.

The PBS is kept in small volumes and sterilise by autoclave at 121°C for 20 – 30 min.

The solution shall be stored at room temperature for a maximum holding time of one month.

3.1.2.5 - Soluzione di Tripsina - Versene per la disaggregazione delle cellule / Trypsin-Versene (EDTA [ethylenediaminetetraacetic acid]):

Tripsina / Trypsin	2,50 g
Versene / Versene(EDTA)	1,00 g

Si aggiunge la soluzione PBS-A (NaCl 8 g; KCl 0,2 g; NaH₂PO₄ 1,15 g; KH₂PO₄ 0,2 g; acqua distillata fino ad 800 ml); e poi H₂O distillata fino ad 1 litro.

Add the Phosphate Buffered Saline PBS –A (dissolve 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,15 g NaH₂PO₄; 0,2 g KH₂PO₄ in water and dilute to 800 ml) in distilled water to 1000 ml. Sterilise by autoclave.

The Trypsin-Versene is kept in small volumes (4 ml) below – 20°C.

3.1.3 – SOSTANZA INTERFERENTE / INTERFERING SUBSTANCES

La sostanza interferente utilizzata è stata scelta in base alle condizioni di utilizzo e alle caratteristiche del prodotto in esame.

The interfering substances shall be chose according to the conditions of use laid down for the product.

3.1.3.1 – Condizioni di pulito (Albumina Bovina o) (BSA) / Clean conditions (bovine serum albumin) (BSA):

In condizioni di superfici otticamente pulite con la presenza di livelli minimi di sostanze organiche e/o inorganiche si utilizza la frazione V di albumina bovina alla concentrazione pari a 0.3% viene sciolta in acqua distillata come segue:

Albumina bovina	frazione V	0,30 g	SIGMA
Acqua distillata		100 ml	

Sterilizzare per filtrazione con membrane filtro con pori di diametro di 0,22 µm.

Bovine serum albumin (BSA): conditions representative of surfaces which have received a satisfactory cleaning programme and/or known to contain minimal levels of organic and/or inorganic substances.

Bovine serum albumin (BSA) shall be prepared as follows:

dissolve 0,03 g of albumin fraction V (suitable for microbiological purpose) in 100 ml of glass double-distilled water; sterilize by membrane filtration (0,22 µm pore size).

The final concentration of bovine serum albumin (BSA) in the test is 0,3 g BSA for litre.

3.1.3.2 - Condizioni di sporco / Dirty conditions:

In condizioni di sporco delle superfici con la presenza significativa di sostanze organiche e/o inorganiche viene utilizzato la soluzione preparata come segue:

a) BSA 0,3% + eritrociti di montone

Albumina bovina	frazione V	3,0 g	SIGMA
Acqua distillata		100 ml	

Sterilizzare per filtrazione con membrane filtro con pori di diametro di 0,22 µm.

Aggiunto:

b) Eritrociti di montone 3,00 g SIGMA

8 ml di sangue defibrinato di montone sono stati centrifugati a 800 rpm; è stato eliminato il surnatante e sono stati risospesi gli eritrociti in diluente; si è ripetuto fino ad ottenere un surnatante limpido.

Sono stati risospesi 3 ml di eritrociti con 97 ml della soluzione di albumina bovina.

La soluzione è stata preparata prima dell'utilizzo.

BSA and sheep erythrocytes: conditions representative of surfaces which have known to or may contain organic and/or inorganic substances.

a) BSA 0,3% shall be prepared as follows:

dissolve, 3,0 g of albumin fraction V (suitable for microbiological purpose) in 100 ml of glass double-distilled water. Sterilize by membrane filtration (0,22 µm pore size).

b) 3,0 ml sheep erythrocytes:

Sheep erythrocytes shall be prepared as follows:

Centrifuge erythrocytes from at least 8 ml defibrinated sheep blood at 800 g for 10 min.. After discarding the supernatant, resuspend the erythrocytes in sterile phosphate buffered saline (PBS).

Repeat this procedure at least three times: the supernatant should be colourless.

3 ml sheep erythrocytes was resuspend in 97 ml of Bovine serum albumin sterile solution

3.1.4 – APPARECCHIATURA / USUAL MICROBIOLOGICAL LABORATORY EQUIPMENT

1. Autoclave a vapore in grado di sterilizzare alla temperatura di 121°C per un tempo minimo di 15' e una pressione interna pari a 1 atm. / *Apparatus for sterilisation for moist heat sterilisation an autoclave capable of being maintained at 121°C for a minimum holding time of 15'*;
2. Stufa per la sterilizzazione a secco alla temperatura di 180°C per un tempo minimo di 30 minuti / *Apparatus for sterilisation for dry heat sterilisation a hot air oven capable of being maintained at 180°C for a minimum holding time of 30 min.*
3. Microscopio invertito per l'osservazione delle colture cellulari. / *Inverted microscope for reading cell culture microscopically.*
4. Cronometro. / *Stopwatch.*
5. Piaccametro. / *pH-meter, having an accuracy of calibration of 0,1 pH units at 25°C.*
6. Agitatore Vortex. / *Electromechanical agitator: Vortex mixer.*
7. Centrifuga. / *Centrifuge.*
8. Dispositivo di filtrazione Millipore (0,22 µm diametro dei pori di filtrazione). / *Membrane filtration apparatus for filtration of media (0,22 µm pore size).*
9. Incubatore CO₂ (5%) in grado di mantenere la temperatura a 36°C ± 1°C. / *CO₂ incubator (95% air, 5% CO₂), capable of being controlled at 36°C ± 1°C, for incubation of cell cultures.*
10. Fabbricatore ghiaccio per conservare le cellule sospese durante il test. / *Ice producing machine to cool the cell maintenance medium and the reaction mixtures during the test.*
11. Agitatore a bascula. / *Mechanical shaker.*
12. Cappa a flusso laminare verticale "BioHazard" classe II. / *Biological safety cabinet with Air Clean Systems Vertical Laminar Flow - "BioHazard" class II.*
13. Bagnomaria termostato. / *Water bath capable of being controlled at 20°C±1°C.*
14. Frigorifero alla temperatura di 2°C ± 8°C. / *Refrigerator at temperature controlled at 2°C±8°C.*
15. Congelatore a -70°C. / *Freezer, capable of being controlled at - 70°C± 1°C.*

4 - CONDIZIONI SPERIMENTALI/ EXPERIMENTAL CONDITIONS

PRODOTTO: “ KILL PLUS NETTUNO “ Lotto 131109

4.1 – PERIODO DI PROVA/ DATE OF TESTING:

Date / Dates of test: 27 nov 2009 ÷ 16 dic 2009 / 2009-11-27 ÷ 2009-12-16.

4.1.1 - TEMPERATURA dell’esperimento: +20°C±2°C./ **TEST TEMPERATURE:** +20°C±2°C.

4.1.2 - CONCENTRAZIONE TEST: Concentrazione d’utilizzo / Concentration of the use : **100%**
TEST CONCENTRATION: *The product is diluted : 100%.*

4.1.3 - DILUENTE /DILUENT: Acqua dura /Hard water.

4.1.4 - TEMPO DI CONTATTO:/ CONTACT TIME:

- **5 minuti./ 5 minutes.**

4.1.5 – VIRUS IN ESAME / TEST VIRUS:

- **Parvovirus Bovine, ceppo Haden, ATCC VR - 767**
- **Poliovirus type 1** (gruppo Picornavirus - RNA virus), **ceppo LSc - 2ab**
- **Adenovirus type 5** (gruppo Adenovirus - DNA virus), **ceppo Adenoid 75, ATCC VR – 5**
- **Herpes simplex virus type 1.**

4.1.6 – COLTURE CELLULARI / CELL CULTURE:

Le cellule HeLa cellule tumorali immortalizzate altamente stabilizzate derivano dal cancro della cervice uterina di Henrietta Lacks (dal cui nome deriva quello delle cellule) utilizzate per la crescita di Poliovirus e Adenovirus (ATCC - University Blvd - LGC Promochem).

Le cellule MDBK provenienti da cellule fetali di polmone di bovino sono cellule immortalizzate utilizzate per la crescita del Parvovirus (ATCC - University Blvd - LGC Promochem).

Le cellule VERO, una linea cellulare di derivazione epiteliale, fibroblasti per la crescita dell’Herpes simplex virus.

Ogni linea cellulare è mantenuta in terreno D-MEM modificato (Dulbecco Minimal Essential Medium) supplementato con siero fetale bovino (FBS) al 10%, Glutamina 2mM ed una miscela di antibiotici-antimicotici (100 U/ml di penicillina, 100 mg/ml di streptomina, 0,25 mg/ml di fungizone), a 37°C in atmosfera contenente CO₂ al 5%.

The cell line established is cultivated at 37°C in a humid atmosphere under 5% CO₂ with D-MEM (Dulbecco Minimum Essential Medium) supplemented with appropriate concentration of inactivated and mycoplasma-free foetal calf serum (FCS) 10%, L-glutammyn 1% and antibiotics penicillin - streptomycin (pen - strep) 1%.

4.1.7 – SOSTANZE INTERFERENTI / INTERFERING SUBSTANCES: INTERFERING PROTEINS

4.1.7.1 – Condizione di pulito (albumina bovina)/ Clean conditions (bovine serum albumin o BSA):

- BSA 0,03% (0,3 g/l albumina bovina /bovine serum albumin).

4.1.7.2 – Condizione di sporco / Dirty conditions:

- BSA 0,3% (3,0 g/l albumina bovina / bovine serum albumin).+ 3,0 ml/l (0,3%) eritrociti / sheep erythrocytes.

5 – METODO DI PROVA / TEST METHOD :**5.1 - PROVE PRELIMINARI / PRELIMINARY TEST****5.1.1 – PREPARAZIONE DELLA SOSPENSIONE VIRALE - TITOLO VIRALE./ PREPARATION OF THE TEST VIRUS SUSPENSION - VIRAL TITRE.**

Lo stock del virus è stato moltiplicato utilizzando la linea cellulare specifica per ogni tipologia di virus, seminata in piastre da 96 pozzetti alla densità di 5×10^5 cell/well e incubate fino al raggiungimento del 95% della confluenza.

Il monostrato cellulare è stato infettato con 100 PFU di virus test corrispondente ad un titolo virale pari a 1×10^7 . Dallo stock virale (soluzione madre) sono state preparate 8 diluizioni seriali 1:10 e aggiunto 100 µl (0,1 ml) di ogni diluizione in ogni pozzetto nella piastra da 96 pozzetti senza D-MEM. Sono stati lasciati senza inoculo 12 pozzetti, che sono serviti da controllo della linea cellulare.

Dopo 1 ora di incubazione a 37°C all'inoculo sono stati aggiunti 100 µl di D-MEM.

Le infezioni sono state poste in incubatore a 37°C per circa 2 - 4 giorni e controllate osservando al microscopio invertito la formazione di placche di lisi, causate dall'effetto citopatico (CPE) della sospensione virale. A questo punto le cellule sono state fissate e colorate con soluzione di cristalvioletto – metanolo e sono state contate le placche presenti nei pozzetti alla diluizione contabile. È stata calcolata l'attività infettante (valutazione TCID₅₀) mediante metodo Spaerman – Karber.

The stock virus suspension has to be multiplied an appropriate cell line VERO to obtain a virus suspension high titres of infectious viruses. Cell monolayers shall be >90 % confluent before inoculation. The cell debris shall then be separated by low speed centrifugation. The minimum titre of the virus suspension is at least 10^7 ID₅₀/ml. Titre values are calculated according to Spaerman - Kärber method. This preparation is called "test virus suspension".

Aliquots of the virus suspension were stored at -70°C. The virus suspension that is used in the virucidal testing of the disinfectant.

5.2 – TEST VIRUCIDA: SAGGIO VERO E PROPRIO / VIRUCIDAL TESTING

In una provetta sono stati aggiunti 100 µl di sostanza interferente: nella condizione di pulito è stato aggiunto lo 0,03% di BSA e in quella di sporco il 0,3% di BSA + 0,3% di siero fetale bovino.

Sono stati aggiunti 100 µl di sospensione del virus test in provette diverse, miscelati con 800 µl di soluzione del prodotto in esame in ogni provetta.

È stato controllato il tempo con il contasecondi. Immediatamente alla fine del tempo di contatto in agitazione sono stati aggiunti 500 µl (0,5 ml) della miscela in 4,5 D-MEM + 2% SFB, mantenuto in ghiaccio, allo scopo di inattivare l'attività della soluzione test. Sono state effettuate le diluizioni fino a 10^{-6} oppure a 10^{-7} , procedendo alla titolazione virale. Per ogni diluizione sono stati inoculati 6 pozzetti in piastre da 12 pozzetti, nei quali sono state seminate cellule alla densità di 5×10^5 cell/well e precedentemente incubate fino al raggiungimento del 95% della confluenza. In 6 pozzetti sono stati aggiunti 100 µl della soluzione in esame. In altri 6 pozzetti, considerati come controllo positivo, sono stati aggiunti 100 µl della soluzione di formaldeide alla concentrazione di 1,4% (w/v) (controllo positivo). Mentre in altri 6 pozzetti non è stato aggiunto nessuna sostanza ad attività antivirale, ma soltanto la sospensione virale (controllo negativo). Dopo 1 ora di incubazione a 37°C all'inoculo sono stati aggiunti 100 µl di D-MEM.

L'infezione delle cellule è stata favorita ponendole a 37°C per un'ora con movimento a bascula. Le infezioni sono state poste in incubatore a 37°C per circa 2 - 4 giorni e controllate, osservando al microscopio invertito la formazione di placche di lisi, causate dall'effetto citopatico (CPE) della sospensione virale. A questo punto le cellule sono state fissate e colorate con la soluzione di cristalvioletto - metanolo e sono state contate le placche presenti nei pozzetti alla diluizione contabile.

È stata calcolata l'attività infettante (valutazione ID₅₀) mediante metodo Spaerman - Kärber.

Quantal test (endpoint titration) - Virus titration on monolayers of cells MDCK on microtiter plates.

Transfer 100 µl of each dilution of viral suspension into six wells of a microtiter plate, containing a confluent (> 90 %) cell monolayer without any medium, beginning with highest dilution.. The virus suspension was added to the test solution of the product under clean (0,03% bovine serum albumin (BSA) fraction V) and dirty (0,3% BSA and 3,0% washed sheep erythrocytes) conditions.

The test assays were mixed as follows:

100 µl virus suspension + 100µl BSA 0,03% (clean condition) or BSA 0,3% and 0,3 erythrocytes (dirty condition) + 800 µl concentrated product (1% in the test mixture).

The last row of six wells will receive 100 µl of culture medium and will serve as the cell control. After 1 h of incubation at 37°C, 0,1 ml of maintenance culture medium is added to each well. Change pipettes for wells when adding medium.

The viral cytopathic effect is read by using an inverted microscope after the appropriate incubation time, according the virus type.

The cell culture results are recorded as "0" for no CPE and "1" (25% CPE) to "4" (100% CPE) depending on degree of the cell damage. The virus titre was calculated using the Spaerman - Kärber method.

Titration of the virus control

The infectivity of the virus suspension shall be determined under test condition at contact times 0 min. and 60 min. The product test solution is substituted by water.

The assay of the virus control were mixed as follows:

100 µl virus suspension + 100 µl BSA 0,03% (clean condition) or BSA 0,3% and 0,3 erythrocytes (dirty condition) + 800 µl double distilled water.

The titration of virus control shall be determined for the contact time. Immediately at the end of a chosen contact time, mix and pipette 0,5 ml of the mixture into 4.5 ml ice-cold MEM + 2% FCS.

5.3 – PROVA DI SENSIBILITÀ CELLULARE AL VIRUS / CELL SENSITIVITY TO VIRUS

Per verificare se la sostanza in esame modifica la sensibilità cellulare all'infezione virale, si è proceduto nel seguente modo:

per ogni concentrazione test della sostanza in esame 0,1 ml del campione di saggio sono stati seminati in 96 pozzetti delle micropiastre contenenti la coltura cellulare a confluenza; altri 96 pozzetti sono stati trattati con 0,1 ml di PBS.

Dopo 1 ora di incubazione a 37°C , le soluzioni della sostanza in esame ed il PBS sono stati eliminati ed è stato eseguito l'inoculo virale nel volume di 0,1 ml secondo il seguente schema: 0,5 ml di sospensione virale + 4,5 ml Medium di coltura.

Dopo 7 giorni di incubazione, la coltura cellulare è stata osservata al microscopio invertito per la rilevazione di ogni effetto citopatico (CPE) dato dalla sospensione virale.

È stata calcolata l'attività infettante (valutazione ID₅₀) mediante metodo Spaerman – Karber.

Comparative virus titrations are performed on cells that have not have been treated with disinfectants to check the reduction of the sensitivity to viruses as follows:

Treatment of cell monolayer: 0,1 ml of the lowest apparently non-citoxic dilution (no microscopic alteration) of the disinfectant or PBS are distributed onto each of 6 to 8 established cell cultures in microtitre plates with 96 wells. After 1 h at 37°C the supernatant is discarded.

Comparative titration of viruses:

The virus is diluted from 10² to 10¹⁰ and titrated on the treated or untreated cells in parallel.

Only those dilutions of the product solution can be used for determination of the residual infectivity which: show a low degree of cell destruction : < 25 % of monolayer or produce a titer reduction of the virus of < 1 log₁₀. Titre values are calculated according to Spaerman – Kärber method.

5.4 – CONTROLLO INATTIVAZIONE / REFERENCE VIRUS INACTIVATION TEST.

Il volume di 200 µl di sospensione virale è stato miscelato con 800 µl di PBS e 1000 µl di soluzione di formaldeide al 1,4 % (w/v) per controllare la validità del sistema. Dopo un contatto di 5 min., 30 min. e 60 minuti, 200 µl di questa soluzione sono stati miscelati a 1800 µl di D-MEM + 2% SFB in ghiaccio. Sono state eseguite le diluizioni seriali 1:10 con PBS + 2% SFB in ghiaccio.

Dopo incubazione a 37°C per 5 minuti a bagnomaria 100 ml di ogni soluzioni sono state trasferite in 6 pozzetti in piastre di 96 pozzetti e poste in incubatore a 37°C per 1 ora. Al termine all'inoculo virale sono stati aggiunti 100 µl di D-MEM.

La coltura cellulare è stata incubata a 37°C per circa 7 giorni e osservata al microscopio invertito per la rilevazione dell'effetto citopatico (CPE) della sospensione virale. A questo punto le cellule sono state fissate e colorate con la soluzione di cristalvioletto - metanolo e sono state contate le placche presenti nei pozzetti alla diluizione contabile.

È stata calcolata l'attività infettante (valutazione ID₅₀) mediante metodo Spaerman – Karber.

Questa verifica è stata condotta prima e in parallelo rispetto al saggio vero e proprio.

The control of the test system is included formaldehyde :

2 ml of the virus suspension shall be mixed with 8 ml of PBS and 10 ml of 1,4 % (w/v) formaldehyde for the control of the system's validity. Contact time are 5 min., 30 min and 60 min..

Immediately at the end of contact time, mix and pipette 0,2 ml of the mixture into a tube containing 1,8 ml ice-cold MEM + 2 % FCS followed by a further 1:10 dilution. Leave the mixture in the ice bath. Dilutions up to 10⁻⁶ are prepared by pipetting the diluted mixture into a next tube containing ice-cold PBS + 2% FCS in the ice bath. The dilution factor should be 10 . The dilutions are kept ice-cold for subsequent testing. Titre values are calculated according to Spaerman – Kärber method.

5.5 - VERIFICA CITOTOSSICITÀ / CYTOTOXICITY

Per verificare la possibile alterazione morfologica delle cellule, provocata dalla sostanza in esame ad attività disinfettante, è stato eseguito il test di citotossicità miscelando 800 µl di soluzione del prodotto test con 200 µl di acqua dura sterilizzata.

Sono state preparate le soluzioni seriali a diluizione 1:10 ed è stato effettuato l'inoculo delle colture cellulari in monostrato <90% di confluenza. Per ogni diluizione sono stati distribuiti 100 µl in 6 pozzetti della piastra. Sono stati lasciati senza inoculo 6 pozzetti, che sono serviti da controllo della linea cellulare VERO. Dopo 1 ora di incubazione sono stati aggiunti 100 µl di MEM.

La coltura cellulare è stata osservata al microscopio invertito costantemente subito dopo l'aggiunta del prodotto in esame e per i successivi 9 giorni per la rilevazione dell'effetto citopatico (CPE) effetto della citotossicità della sostanza in esame.

To check possible morphological alterations of VERO cells caused by the test product, eight parts of the test product were diluted with one part of interfering substance and one part of doubly distilled water. Serial dilutions (1:10) were prepared in culture medium, and 100 µl were inoculated into confluent VERO cell monolayers in a 96-well plates.

To check for possible morphological alteration of cells by the test product disinfectant, 2 ml of sterile hard water are mixed with 8 ml of the product test solution. Serial dilutions (dilution step 1:10) are prepared in the culture medium and are inoculated into cell cultures monolayer. Any microscopic changes in the cells are recorded when reading the tests for CPE.

CYTOTOXICITY CONTROL OF THE FORMALDEHYDE TEST SOLUTION

To control for the cytotoxicity of the formaldehyde test solution, 1 ml of 1,4 % (w/v) formaldehyde was added to 1 ml of PBS. This dilution is further diluted to 10⁻⁹ in an ice bath.

6- CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI. / CALCULATION AND EXPRESSION OF RESULTS**6.1- Determinazione del titolo di infettività (ID₅₀). / Calculation of infectivity titer (ID₅₀/PFU).**

L'attività infettante è stata determinata con il metodo Spaerman - Kärber, che utilizza la seguente formula per il calcolo del valore ID₅₀:

$-\log_{10} ID_{50} = - (x_0) - \{ [R/100] - 0,5 \} \times \log_{10}$ fattore di diluizione

Dove:

$x_0 = \log_{10}$ della diluizione più bassa con il 100% di reazione positiva (CPE)

R = sommatoria (%) delle colture positive

Il prodotto in esame è considerato **VIRUCIDA** quando, dopo il tempo di contatto, produce una riduzione del titolo virale di almeno **4 log₁₀ (Riduzione del 99,999%)**.

The appropriate method of calculation is Spaerman – Kärber method.

The ID₅₀ can be estimated with the following formula:

$-\log_{10} ID_{50} = - (x_0) - \{ [R/100] - 0,5 \} \times \log_{10}$ of dilutions

Where:

$x_0 = \log_{10}$ of the highest virus concentration used (CPE)

R = sum of % affected at each dilution

*The product test has **VIRUCIDAL ACTIVITY**, after contact time test, demonstrate at least of **4 log₁₀ reduction** of the virus.*

The cytotoxicity of the product solution does not affect cell morphology and growth or susceptibility for the test virus in the dilutions of the test mixtures which are necessary to demonstrate a 4 log₁₀ reduction of the virus.

7 – VERIFICA DEL METODO / VERIFICATION OF THE METHODOLOGY

La prova di attività virucida è valida quando nelle prove preliminari si ottengono i seguenti risultati / The test is only valid if the following criteria are fulfilled:

7.1 - VERIFICA SENSIBILITÀ CELLULARE AL VIRUS / VALIDITY OF THE CELL SENSITIVITY TEST

La differenza del valore ID₅₀ tra le colture cellulari trattate con il prodotto in esame e quelle non trattate con il prodotto in esame deve essere <1 log₁₀.

The comparative virus titration on cells treated with test mixture dilutions or without, i.e. only addition of PBS, result in a difference of < 1 log₁₀ of virus titre.

7.2 - VERIFICA SOPPRESSIONE DISINFETTANTE / VALIDITY INACTIVATION TEST DISINFECTANT

La differenza del valore ID₅₀ tra le colture cellulari trattate con il prodotto in esame inattivato e quelle trattate solo con l'inoculo virale deve essere ≤0,5 log₁₀.

The comparative virus titration on cells treated with inactivated product and cell treated with viral suspension, result in a difference ≤0,5 log₁₀ of virus titre.

7.3 – CONTROLLO INATTIVAZIONE VIRALE / REFERENCE VIRUS INACTIVATION TEST.

La differenza del valore ID₅₀ tra le colture cellulari trattate con le sospensioni virali inattivate e quelle trattate con le sospensioni virali attive deve essere, dopo 60 minuti di incubazione tra 2 log₁₀ e 4,5 log₁₀ e dopo 30 minuti di incubazione tra 0,5 log₁₀ e 2,5 log₁₀.

*The difference of the logarithmic titre of the virus control minus the logarithmic titre of the test virus in the reference inactivation test is between **10^{0,5}** (0,5 log) and **10^{2,5}** (2,5 log) after 30 min and **10²** (2 log) and **10^{4,5}** (4,5 log) after 60 min..*

8 – RISULTATI / RESULTS

8.1 – CONVALIDA / VALIDATION OF TEST RESULTS

8.1.1 - Titolo attività virale

Titolazione virus/ Viral titre: **Parvovirus Bovine, ceppo Haden, ATCC VR – 767**

ID₅₀ = -7,00 PROVA VALIDA / The test is VALID

Titolazione virus/ Viral titre: **Poliovirus type 1, ceppo LSc - 2ab**

ID₅₀ = -7,17 PROVA VALIDA / The test is VALID

Titolazione virus/ Viral titre: **Adenovirus type 5, ceppo Adenoid 75, ATCC VR – 5**

ID₅₀ = -7,00 PROVA VALIDA / The test is VALID

Titolazione virus/ Viral titre: **Virus Herpes Simplex type 1**

ID₅₀ = -7,00 PROVA VALIDA / The test is VALID

8.1.2 - VERIFICA SENSIBILITÀ CELLULARE AL VIRUS / VALIDITY OF THE CELL SENSITIVITY TEST

Parvovirus Bovine, ceppo Haden, ATCC VR – 767:

Titolazione virale su cellule trattate con il prodotto in esame (concentrazione 100%):ID₅₀ = -6,83

Titolazione virale su cellule trattate con PBS:ID₅₀ = -7,00

Differenza = 0,17 PROVA VALIDA / The test is VALID

Poliovirus type 1, ceppo LSc - 2ab

Titolazione virale su cellule trattate con il prodotto in esame (concentrazione 100%):ID₅₀ = -7,00

Titolazione virale su cellule trattate con PBS:ID₅₀ = -7,17

Differenza = 0,17 PROVA VALIDA / The test is VALID

Adenovirus type 5, ceppo Adenoid 75, ATCC VR – 5

Titolazione virale su cellule trattate con il prodotto in esame (concentrazione 100%):ID₅₀ = -6,67

Titolazione virale su cellule trattate con PBS:ID₅₀ = -7,00

Differenza = 0,33 PROVA VALIDA / The test is VALID

Virus Herpes Simplex type 1

Titolazione virale su cellule trattate con il prodotto in esame (concentrazione 100%):ID₅₀ = -7,00

Titolazione virale su cellule trattate con PBS:ID₅₀ = -7,00

Differenza = 0,00 PROVA VALIDA / The test is VALID

8.1.3 - VERIFICA SOPPRESSIONE DISINFETTANTE / VALIDITY INACTIVATION TEST DISINFECTANT

Parvovirus Bovine, ceppo Haden, ATCC VR - 767

Titolazione virale su cellule trattate con il disinfettante disattivato (concentrazione 100%) in presenza di sostanze interferenti:ID₅₀ = -7,17

Virus titration on cells treated without inactivation test, only addition of PBS:ID₅₀ = -7,17

Differenza titolazione virale su cellule trattate con disinfettante disattivato con titolazione virale in presenza di sostanze interferenti:

0,17 PROVA VALIDA / The test is VALID

Poliovirus type 1, ceppo LSc - 2ab

Titolazione virale su cellule trattate con il disinfettante disattivato (concentrazione 100%) in presenza di sostanze interferenti:ID₅₀ = -7,00

Virus titration on cells treated without inactivation test, only addition of PBS:ID₅₀ = -7,00

Differenza titolazione virale su cellule trattate con disinfettante disattivato con titolazione virale in presenza di sostanze interferenti:

0,00 PROVA VALIDA / The test is VALID

Adenovirus type 5, ceppo Adenoid 75, ATCC VR – 5

Titolazione virale su cellule trattate con il disinfettante disattivato (concentrazione 100%) in presenza di sostanze interferenti:ID₅₀ = -7,00

Virus titration on cells treated without inactivation test, only addition of PBS:ID₅₀ = -7,00

Differenza titolazione virale su cellule trattate con disinfettante disattivato con titolazione virale in presenza di sostanze interferenti:

0,00 PROVA VALIDA / The test is VALID

Virus Herpes Simplex type 1

Titolazione virale su cellule trattate con il disinfettante disattivato (concentrazione 100%) in presenza di sostanze interferenti:ID₅₀ = -6,83

Virus titration on cells treated without inactivation test, only addition of PBS:ID₅₀ = -6,83

Differenza titolazione virale su cellule trattate con disinfettante disattivato con titolazione virale in presenza di sostanze interferenti:

0,17 PROVA VALIDA / The test is VALID

8.1.4 – CONTROLLO INATTIVAZIONE VIRALE/ REFERENCE VIRUS INACTIVATION TEST:

Poliovirus type 1, ceppo LSc - 2ab

Titolazione virale su cellule trattate con la sospensione virale senza inattivazione in PBS:ID₅₀ = -6,67

Titolazione virale su cellule trattate con virus inattivato con formaldeide dopo 30 minuti:ID₅₀ = -4,33

Differenza con titolazione virale sospensione virale attiva:2,34 PROVA VALIDA

Virus titration on cells treated without inactivation test, only addition of PBS:ID₅₀ = -6,67

Virus titration on cells treated with reference inactivation test after 30 min:ID₅₀ = -4,33

Difference of the logarithmic titre of the virus control minus the logarithmic titre of the virus in the reference inactivation test:2,34 PROVA VALIDA / The test is VALID

Titolazione virale su cellule trattate con virus inattivato con formaldeide dopo 60 minuti:ID₅₀ = - 2,67

Differenza con titolazione virale sospensione virale attiva:4,00 PROVA VALIDA

Virus titration on cells treated with reference inactivation test after 60 min: ID₅₀ = - 2,67

Difference of the logarithmic titre of the virus control minus the logarithmic titre of the virus in the reference inactivation test:4,00 PROVA VALIDA / The test is VALID

8.2 – TABELLE/ TABLES**ATTIVITÀ VIRUCIDA/ VIRUCIDAL ACTIVITY**

I risultati del prodotto in esame “ KILL PLUS NETTUNO “ Lotto 131109 ottenuti nelle condizioni sperimentali sono riportati negli allegati. I risultati di riduzione logaritmica sono riassunti nelle seguenti tabelle:

The product “ KILL PLUS NETTUNO “ Lotto 131109, when tested under the test conditions experimental, demonstrate at least a decimal log reduction of 4 in virus titre test strains .The test results demonstrate in the following Tables::

8.2.1-Tabella 1: Parvovirus Bovine, ceppo Haden, ATCC VR - 767

Prodotto/ Test Product	Condizioni di prova/ Experimental conditions		Citotossicità/ Cytotoxicity	Titolo sospensione virale/ Titre of the virus control (-log ₁₀ ID ₅₀)	-log ₁₀ ID ₅₀				Riduzione >4 log dopo il tempo di contatto in esame/ >4 lg reduction after test contact time
	Conc. %	Sostanze interferenti/ Interfering substances			Tempo di contatto (minuti)/ Contact time(min)				
					0'	5'	30'	60'	
KILL PLUS NETTUNO LOTTO 131109	100%(v/v)	0,3 gr/l BSA	/		6,83	2,68			>4 log
KILL PLUS NETTUNO LOTTO 131109	100%(v/v)	3 gr/l BSA+ 3 ml/l erythrocytes	/		7,00	3,00			4 log
KILL PLUS NETTUNO LOTTO 131109	100%(v/v)	/	3,5		7,00	2,68			>4 log
Formaldehyde	0,7%(w/v)	PBS	/		6,68	2,68	2,68	2,33	≥4 log
Formaldehyde	/	/	3,0		/	/	/	/	/
Virus control (Parvovirus)	n.a.	PBS	n.a.	7,00	/	n.d.	n.d.	7,17	n.a.
Virus control (Parvovirus)	n.a.	0,3 gr/l BSA	n.a.	7,17	/	n.d.	n.d.	7,00	n.a.
Virus control (Parvovirus)	n.a.	3 gr/l BSA+ 3 ml/l erythrocytes	n.a.	7,00	/	n.d.	n.d.	7,00	n.a.

n.a.=non applicabile/ n.a.=not applicable

n.d.=non determinabile/ n.d.=not done

8.2.2-Tabella 2: *Poliovirus* type 1, ceppo LSc - 2ab

Prodotto/ Test Product	Condizioni di prova/ <i>Experimental conditions</i>		Citotossicità/ Cytotoxicity	Titolo sospensione virale/ <i>Titre of the virus control</i> (-log ₁₀ ID ₅₀)	-log ₁₀ ID ₅₀				Riduzione >4 log dopo il tempo di contatto in esame/ >4 lg reduction after test contact time
	Conc. %	Sostanze interferenti/ <i>Interfering substances</i>			Tempo di contatto (minuti)/ <i>Contact time(min)</i>				
					0'	5'	30'	60'	
KILL PLUS NETTUNO LOTTO 131109	100%(v/v)	0,3 gr/l BSA	/		7,00	3,00			4 log
KILL PLUS NETTUNO LOTTO 131109	100%(v/v)	3 gr/l BSA+ 3 ml/l erythrocytes	/		7,00	3,00			4 log
KILL PLUS NETTUNO LOTTO 131109	100%(v/v)	/	3,5		6,83	2,83			4 log
Formaldehyde	0,7%(w/v)	PBS	/		6,50	2,50	2,00	1,83	≥4 log
Formaldehyde	/	/	3,0		/	/	/	/	/
Virus control (<i>Poliovirus</i>)	n.a.	PBS	n.a.	7,00	/	n.d.	n.d.	7,00	n.a.
Virus control (<i>Poliovirus</i>)	n.a.	0,3 gr/l BSA	n.a.	7,00	/	n.d.	n.d.	7,00	n.a.
Virus control (<i>Poliovirus</i>)	n.a.	3 gr/l BSA+ 3 ml/l erythrocytes	n.a.	7,00	/	n.d.	n.d.	7,00	n.a.

n.a.=non applicabile/ *n.a.=not applicable*n.d.=non determinabile/ *n.d.=not done*

8.2.3-Tabella 3: Adenovirus type 5, ceppo Adenoid 75, ATCC VR – 5

Prodotto/ Test Product	Condizioni di prova/ Experimental conditions		Citotossicità/ Cytotoxicity	Titolo sospensione virale/ Titre of the virus control (-log ₁₀ ID ₅₀)	-log ₁₀ ID ₅₀				Riduzione >4 log dopo il tempo di contatto in esame/ >4 lg reduction after test contact time
	Conc. %	Sostanze interferenti/ Interfering substances			Tempo di contatto (minuti)/ Contact time(min)				
					0'	5'	30'	60'	
KILL PLUS NETTUNO LOTTO 131109	100%(v/v)	0,3 gr/l BSA	/		7,17	3,17			4 log
KILL PLUS NETTUNO LOTTO 131109	100%(v/v)	3 gr/l BSA+ 3 ml/l erythrocytes	/		7,00	3,50			<4 log
KILL PLUS NETTUNO LOTTO 131109	100%(v/v)	/	3,5		7,00	4,00			<4 log
Formaldehyde	0,7%(w/v)	PBS	/		7,00	3,00	2,68	2,50	≥4 log
Formaldehyde	/	/	3,0		/	/	/	/	/
Virus control (Adenovirus)	n.a.	PBS	n.a.	7,17	/	n.d.	n.d.	7,17	n.a.
Virus control (Adenovirus)	n.a.	0,3 gr/l BSA	n.a.	7,17	/	n.d.	n.d.	7,33	n.a.
Virus control (Adenovirus)	n.a.	3 gr/l BSA+ 3 ml/l erythrocytes	n.a.	7,00	/	n.d.	n.d.	7,00	n.a.

n.a.=non applicabile/ n.a.=not applicable

n.d.=non determinabile/ n.d.=not done

8.2.4 Tabella 4: *Virus Herpes Simplex type 1*

Prodotto/ Test Product	Condizioni di prova/ Experimental conditions		Citotossicità/ Cytotoxicity	Titolo sospensione virale/ Titre of the virus control (-log ₁₀ ID ₅₀)	-log ₁₀ ID ₅₀				Riduzione >4 log dopo il tempo di contatto in esame/ >4 lg reduction after test contact time
	Conc. %	Sostanze interferenti/ Interfering substances			Tempo di contatto (minuti)/ Contact time(min)				
					0'	5'	30'	60'	
KILL PLUS NETTUNO LOTTO 131109	100%(v/v)	0,3 gr/l BSA	/		7,00	2,83			>4 log
KILL PLUS NETTUNO LOTTO 131109	100%(v/v)	3 gr/l BSA+ 3 ml/l erythrocytes	/		7,00	2,83			4 log
KILL PLUS NETTUNO LOTTO 131109	100%(v/v)	/	3,5		7,00	2,83			>4 log
Formaldehyde	0,7%(w/v)	PBS	/		6,50	4,00	4,00	2,50	≥4 log
Formaldehyde	/	/	3,0		/	/	/	/	/
Virus control (<i>Herpes simplex</i>)	n.a.	PBS	n.a.	7,00	/	n.d.	n.d.	7,00	n.a.
Virus control (<i>Herpes simplex</i>)	n.a.	0,3 gr/l BSA	n.a.	7,00	/	n.d.	n.d.	7,00	n.a.
Virus control (<i>Herpes simplex</i>)	n.a.	3 gr/l BSA+ 3 ml/l erythrocytes	n.a.	7,00	/	n.d.	n.d.	7,33	n.a.

n.a.=non applicabile/ n.a.=not applicable

n.d.=non determinabile/ n.d.=not done

9 – CONCLUSIONI / CONCLUSIONS:

Sulla base dei risultati ottenuti, nelle condizioni sperimentali adottate, il prodotto in esame "KILL PLUS NETTUNO - LOTTO 131109 ", alla concentrazione pari all'100% (pronto all'uso) possiede **ATTIVITÀ VIRUCIDA** nei confronti di tutti i virus test, *Parvovirus Bovine, ceppo Haden, ATCC VR – 767, Poliovirus type 1, ceppo LSc - 2ab, Adenovirus type 5, ceppo Adenoid 75, ATCC VR – 5 e Herpes simplex type 1*, dopo 5 minuti di contatto, in presenza di condizione di pulito (0,3 gr/l BSA), applicando i criteri di validità e le metodiche di saggio previsti dalla UNI EN 14476:2007 (Fase 2 / Stadio 1).

*According to EN 14476: 2007 - Phase 2 /Step 1 standard., the " KILL PLUS NETTUNO " - Batch 131109, at concentration 100% (ready use), possesses **virucidal activity** in 5 minutes under clean condition (3,0 gr/l BSA) for referenced strains *Parvovirus Bovine, Haden, ATCC VR – 767, Poliovirus type 1, ceppo LSc - 2ab, Adenovirus type 5, Adenoid 75, ATCC VR and Herpes simplex type 1.**

Ferrara: 16 Dicembre 2009

Ferrara: December 16th 2009



Pier Giorgio Balboni

(Firma/Signature: Prof. Pier Giorgio Balboni)

UNIVERSITA DI FERRARA

DPT. DI MEDICINA SPERIMENTALE E DIAGNOSTICA

SEZIONE DI MICROBIOLOGIA

UNIVERSITY OF FERRARA

DPT. EXP. & DIAGNOSTIC MEDICINE

SECTION OF MICROBIOLOGY



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA / UNIVERSITY OF FERRARA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE E DIAGNOSTICA / DPT. EXP. & DIAGNOSTIC MEDICINE
SEZIONE DI MICROBIOLOGIA / SECTION OF MICROBIOLOGY
via LUIGI BORSARI, 46 – 44100 FERRARA - ITALY

TEST REPORT EFFICACIA BATTERICIDA / TEST BACTERICIDAL EFFICACY TEST

Rapporto finale del saggio sulla valutazione efficacia disinfettante secondo le

Norme europee

Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività battericida
(prEN 12054 – Fase 2 / Stadio 1)

PRODOTTO / PRODUCT:

<< KILL PLUS NETTUNO >>
LOTTO 131109

COMMITTENTE / CUSTOMER:

NETTUNO SRL

Viale Industria, 16/18
24060 Caselli Calepio (BG)

Ferrara: 14/12/2009
Ferrara: December 14th 2009

Prodotto / Product: << KILL PLUS NETTUNO >>

LOTTO 131109

COMMITTENTE / CUSTOMER:

NETTUNO SRL

Viale Industria, 16/18

24060 Caselli Calepio (BG)

INDICE:

INTRODUZIONE	pag.	3
TERMINI E DEFINIZIONI	pag.	3
CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE IN ESAME	pag.	4

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ BATTERICIDA IN SOSPENSIONE:

METODO DI PROVA.

**Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività battericida
(prEN 12054 – Fase 2 / Stadio 1)**

PROCEDURA SPERIMENTALE	pag.	5
1 SISTEMA DI SAGGIO	pag.	5
2 CONDIZIONI SPERIMENTALI	pag.	7
3 ESECUZIONE DEL SAGGIO	pag.	8
4 CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI	pag.	10
RISULTATI	pag.	11
CONCLUSIONI	pag.	12
APPENDICI	pag.	13

INTRODUZIONE:

Valutazione dell'attività battericida in sospensione, in base rispettivamente alla norma pr EN 12054, che specificano i metodi di prova ed i requisiti minimi per stabilire l'attività battericida di un prodotto impiegato per il trattamento igienico delle mani.

TERMINI E DEFINIZIONI

Battericida: agente chimico o una formulazione che uccide le forme batteriche vegetative in determinate condizioni.

Attività battericida: la capacità di un prodotto di produrre una riduzione nel numero di batteri in determinate condizioni.

Attività battericida (prEN 12054): Capacità del prodotto di dare luogo ad una riduzione di almeno 10^5 nel numero di cellule batteriche vitali, appartenenti ai ceppi di riferimento di *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ed *Enterococcus hirae*, nelle condizioni definite dalla presente norma europea.

cfu/ml: il numero di microrganismi contati in unità formanti colonie (unità vitali) cresciuti su piastre con terreno di coltura in agar riferiti ad un millilitro.

Prodotto (antisettico e/o per disinfezione chimica): Agente chimico, o formulazione chimica, utilizzato come disinfettante chimico e/o antisettico [prEN 12054].

CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE IN ESAME

Denominazione della formulazione in esame:

<< KILL PLUS NETTUNO >>

LOTTO 131109

COMMITTENTE / CUSTOMER:

NETTUNO SRL

Viale Industria, 16/18

24060 Caselli Calepio (BG)

Descrizione:

Il campione, denominato << KILL PLUS NETTUNO >> **LOTTO 131109**>> è un liquido studiato per l'igiene delle mani senza bisogno di risciacquare. È una formulazione in soluzione con antibatterico per essere attivo nei confronti dei batteri presenti sulla cute delle mani.

È sufficiente spruzzare o versare una quantità di liquido sul palmo delle mani e strofinare fino a completa asciugatura.

DITTA PRODUTTRICE: **NETTUNO – CALEPIO (BG).**

Composizione:

1	AQUA
2	DIDECYLDIMONIUM CHLORIDE
3	GLYCERIN
4	PEG-40 HYDROGENATED CASTOR OIL
5	PARFUM
6	BENZALCONIUM CHLORIDE

SPECIFICHE CHIMICO-FISICHE

ASPETTO	LIQUIDO TRASPARENTE
COLORE	VERDE SMERALDO
ODORE	CARATTERISTICO

Concentrazione d'uso: pronto all'uso per l'igiene delle mani senza risciacquo.

Tempo di contatto:

- **1 minuto.**

Periodo di Analisi dal 27/11/2009 al 14/12/2009.

PROCEDURA SPERIMENTALE

PRODOTTO: << KILL PLUS NETTUNO >>

LOTTO 131109

1. SISTEMA DI SAGGIO

1.1 Microorganismi

Sono stati utilizzati i seguenti ceppi test:

BATTERI:

Escherichia coli ATCC 10536

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442

Enterococcus hirae ATCC 10541

Centro di provenienza

I ceppi provengono dal Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Sezione di Microbiologia, dell'Università di Ferrara e sono stati acquistati dalle ditte Diagnostic International Distribution SpA e VWR International Srl.

Mantenimento

I ceppi batterici sono stati mantenuti congelati in brodo di coltura e glicerolo al 50% (v/v); prima dell'utilizzo sono stati trapiantati su slant di TSA e conservati in frigorifero a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

2. TERRENI CULTURALI E REAGENTI

Generalità

I reagenti devono essere puri per analisi e/o adatti per applicazioni microbiologiche.

2.1 Tryptone Soya Agar (TSA)

2.3 **Diluente**

Soluzione di cloruro di sodio e di triptone:

Triptone, digestione pancreatica di caseina 1,0 g

NaCl 8,5 g

Acqua fino a 1 000,0 ml

Sterilizzare in autoclave. Dopo sterilizzazione il pH del mezzo deve essere di $7,0 \pm 0,2$ se la misurazione viene effettuata a 20°C .

2.4 Neutralizzante

Il neutralizzante deve essere validato per il prodotto sottoposto a prova.

È stato scelto il neutralizzante contenente :

Lecitina 0,3 %

Polisorbato 80 3,0 %,

L-istidina 0,1%

Saponina 3,0 %

Cisteina 0,1 %

Acqua distillata q.b. a 100 ml

Sterilizzare in autoclave. Dopo sterilizzazione il pH del mezzo deve essere di $7,0 \pm 0,2$ se la misurazione viene effettuata a 20 °C.

3. APPARECCHIATURA

- Stufa per la sterilizzazione a secco	KW
- Autoclave a vapore	COLUSSI
- Termostato	MEMMERT
- pHmetro	BECKMAN
- Agitatore Vortex	VELP
- Cronometro	ARBORE
- Micropipette	GILSON

2. CONDIZIONI SPERIMENTALI

2.1 Temperatura del test

Il test è stato eseguito a $+20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.2 Concentrazione

La formulazione in esame << **KILL PLUS NETTUNO** >> **LOTTO 131109**>> è un liquido trasparente verde smeraldo pronto all'uso per l'igiene delle mani senza risciacquo ed è stata sottoposta al metodo di prova tal quale senza diluizione.

2.3 Tempi di contatto

È stato utilizzato il seguente tempo di contatto:

- **1 minuto.**

2.4 Neutralizzante

È stato scelto il seguente neutralizzante:

Lecitina	3 g	MERCK
Polisorbato 80	30 g	MERCK
L-istidina	1 g	MERCK
Saponina	30 g	SIGMA
Cisteina	1 g	MERCK
Acqua distillata q.b. a	100 ml	

3. ESECUZIONE DEL SAGGIO

Il campione di saggio, le sospensioni batteriche, il diluente e il neutralizzante sono stati preventivamente stabilizzati alla temperatura $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Preparazione delle sospensioni batteriche

I ceppi batterici, una volta scongelati, sono stati trapiantati per 2 volte di seguito su slant di TSA e incubati a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18 ore, ottenendo la coltura di lavoro. Entro 2 ore dall'inizio del test la coltura di lavoro è stata sospesa in diluente usando palline di vetro e la sospensione è stata diluita fino ad ottenere una conta da 1.5×10^7 a 3.0×10^7 cfu/ml (sospensione batterica).

3.1 SAGGIO PRELIMINARE

Conteggio delle sospensioni batteriche (N_v)

Le sospensioni batteriche sono state diluite con diluizioni seriali fino ad ottenere una concentrazione compresa tra 1.0×10^7 e 3.0×10^7 cfu/ml. Questa sospensione è stata ulteriormente diluita con diluizioni decimali seriali da 10^{-2} fino a 10^{-6} .

È stato prelevato 1 ml, in doppio, da ogni diluizione ed effettuato un conteggio per inclusione in TSA in doppio. È stato determinato il numero di unità formanti colonia/ml incubazione di 48 ore a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; è stato poi calcolato il valore di N_v .

CONVALIDA DELLE CONDIZIONI SPERIMENTALI

Convalida della non tossicità del neutralizzante (B)

1 ml di acqua è stato aggiunto a 9 ml di neutralizzante. Dopo il tempo di neutralizzazione di 5 minuti ± 10 secondi, sono stati inoculati separatamente 0.1 ml di sospensione batterica e 0.1 ml di sospensione di lievito e lasciati a contatto alla temperatura e al tempo di contatto previsti dal test.

Al termine del tempo di contatto, la miscela è stata diluita con diluizioni decimali da 10^{-1} fino a 10^{-3} . Da ogni diluizione, in doppio, è stato prelevato 1 ml e posto in piastre Petri in inclusione in TSA.

Dopo incubazione delle piastre batteriche di 48 ore alla temperatura rispettivamente di $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, è stato quindi determinato il numero di colonie espresse in cfu/ml (B).

Convalida della neutralizzazione (C)

Per ogni ceppo batterico e per la concentrazione del campione in esame è stata allestita una provetta contenente 1 ml di neutralizzante e 1 ml di *sospensione di convalida* (N_v) avente una concentrazione compresa tra 6.0×10^2 e 3.0×10^3 cfu/ml, alla temperatura prevista dal test.

Dopo un periodo di contatto di 2 minuti sono stati aggiunti 8 ml di acqua e lasciati a contatto alla temperatura e per il tempo di contatto del test.

Terminato il tempo di contatto, 0.1 ml della miscela è stato prelevato in doppio e posto in piastre Petri in inclusione in TSA. Dopo incubazione delle piastre batteriche di 48 ore alla temperatura rispettivamente di $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, è stato quindi determinato il numero di colonie espresse in cfu/ml (C).

3.2 SAGGIO VERO E PROPRIO

Conteggio delle sospensioni batteriche (N)

Sono state effettuate diluizioni seriali fino a 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} delle sospensioni batteriche aventi concentrazione da 1.5×10^8 a 3.0×10^8 cfu/ml. È stato effettuato un conteggio in doppio per inclusione in TSA. È stato determinato il numero di unità formanti colonia / ml della sospensione dopo un periodo di incubazione di 48 ore a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$; è stato quindi calcolato il valore di **N**.

Esecuzione del saggio (N_a)

Per ogni ceppo batterico e per la concentrazione del campione in esame è stata allestita una provetta contenente 1 ml di *sospensione microbica test* avente una concentrazione tra 1.5×10^8 e 3.0×10^8 ufc/ml, alla temperatura prevista dal test. Dopo sono stati aggiunti 8 gr. di sostanza in esame e lasciati a contatto per il tempo di contatto stabilito e alla temperatura di esecuzione del test.

Terminato il tempo di contatto, è stato prelevato, in doppio, 1 ml di miscela test e sono stati aggiunti 9 ml di neutralizzante. Dopo il tempo di neutralizzazione di 5 minuti \pm 10 secondi, la miscela è stata diluita con diluente con diluizioni decimali seriali da 10^{-1} fino a 10^{-3} .

È stato prelevato 1 ml, in doppio, dalla miscela e dalle sue diluizioni e posto in piastre Petri per effettuare un conteggio per inclusione in TSA per i batteri.

In parallelo lo stesso procedimento è stato ripetuto sostituendo la sostanza in esame con il diluente.

Dopo incubazione delle piastre batteriche di 48 ore alla temperatura rispettivamente di $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, è stato quindi determinato il numero di colonie espresse in cfu/ml o numero di unità formanti colonie/piastra per ogni diluizione, calcolando il valore di N_a .

4. CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

4.1 Calcolo delle unità vitali (ufc/ml)

Per il saggio vero e proprio (N_a), per il saggio preliminare (B, C ed N_v) e per la sospensione di prova (N) il calcolo della conta batterica viene effettuato nel seguente modo:

$$\text{cfu/ml} = C / (n \times V \times d)$$

Dove:

C = somma delle colonie contate su entrambe le piastre

n = numero delle piastre contate

V = volume usato

d = fattore di diluizione corrispondente alla diluizione effettuata

Il conteggio è stato effettuato usando il numero delle colonie contate su entrambe le piastre.

Solo le piastre contenenti da 15 a 300 colonie sono state usate per il calcolo dei risultati.

Nel saggio vero e proprio, dove il numero di ufc su tutte le piastre contate era <15 , è stato registrato il numero di ufc/ml come 1.5×10^2 . Dove il numero di ufc su tutte le piastre contate era >300 è stato registrato il numero di ufc/ml come $>3.0 \times 10^3$.

4.2 Calcolo della riduzione della vitalità

Per ogni microrganismo e per ogni concentrazione test è stata calcolata la riduzione della vitalità applicando la seguente formula:

$$R = (N \times 10^{-1}) / N_a$$

Dove:

R = riduzione della vitalità

N = conta batterica della sospensione di prova

N_a = conta batterica della miscela test al termine del tempo di contatto

La sostanza in esame è considerata **BATTERICIDA** quando, per ogni ceppo batterico, a 20°C dopo un tempo di contatto in esame, provoca una **riduzione della vitalità di almeno 10^5** , corrispondenti a una riduzione pari **5 logaritmi (99,999%)**.

Parametri di validazione:

Per ogni microrganismo test:

a) N compresa tra $1,5 \times 10^8$ cfu/ml e $5,0 \times 10^8$ cfu/ml

b) N_v compreso tra $3,0 \times 10^2$ e $1,6 \times 10^3$

N_{v0} compreso tra 30 and 160 cfu/ml ($3,0 \times 10^1$ e $1,6 \times 10^2$)

$B \geq 0.5 \times N_{v0}$

$C \geq 0.5 \times N_{v0}$

RISULTATI**1. SAGGIO VERO E PROPRIO**

1.1 - I valori di riduzione di vitalità (R) alla concentrazione 100 % << **KILL PLUS NETTUNO** >> **LOTTO 131109**>> sono riportati nella tabella seguente:

1) ATTIVITÀ ANTIBATTERICA SECONDO IL METODO DI PROVA QUANTITATIVO IN SOSPENSIONE (prEN 12054–Fase 1/Stadio 2)

MICROORGANISMI TEST	Log₁₀ SOSPENSIONE BATTERICA TEST	RIDUZIONE MICROBICA	
		TEMPI DI CONTATTO	
		1 min	
		Log₁₀	% RID
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	8,3	5.2	>99,999
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	8,5	5	>99,999
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8,3	5.1	>99,999
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	8,3	5.1	>99,999

CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti, rispettati i criteri di validità del saggio, la formulazione in esame << **KILL PLUS NETTUNO** >> **LOTTO 131109**>>, pronta all'uso, è risultata **BATTERICIDA** nei confronti di *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Enterococcus hirae* ATCC 10541 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 **dopo 1 minuto di contatto** secondo quanto previsto dalla norma prEN 12054 – Fase 1 / Stadio2.

Ferrara: 14/12/2009

Ferrara: December 14th 2009



Pier Giorgio Balboni

(Firma Prof. Pier Giorgio Balboni)
UNIVERSITA DI FERRARA
DPT. DI MEDICINA SPERIMENTALE E DIAGNOSTICA
SEZIONE DI MICROBIOLOGIA

APPENDICE:

MICROORGANISMI TEST	VALIDAZIONE			TEST	
	N _v	B	C	N	RIDUZIONE dopo TEMPO DI CONTATTO
					1 minuto
<i>Escherichia coli</i>	V _c =130 N _v =1,3x10 ³	V _c =100/140 B =1,2x10 ²	V _c =110/110 C =1,1x10 ²	V _c =200 N =2,0x10 ⁸	V _c =23 N _a =2,3x10 ² R: 1,22x10 ⁵ =5.2 Log ₁₀
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	V _c =130 N _v =1,3x10 ³	V _c =120/120 B =1,2x10 ²	V _c =120/110 C =1,15x10 ²	V _c =320 N=3,2x10 ⁸	V _c =38 N _a =3,8x10 ² R: 1,0x10 ⁵ =5.0 Log ₁₀
<i>Staphylococcus aureus</i>	V _c =75 N _v =7,5x10 ²	V _c =100/100 B =1,0x10 ²	V _c =140/120 C =1,3x10 ²	V _c =200 N =2,0x10 ⁸	V _c =15 N _a =1,5x10 ² R: 1,23x10 ⁵ =5.1 Log ₁₀
<i>Enterococcus hirae</i>	V _c =160 N _v =1,6x10 ³	V _c =100/100 B =1,0x10 ²	V _c =100/100 C =1,0x10 ²	V _c =200 N=2,0x10 ⁸	V _c =23 N _a =2,3x10 ² R: 1,2x10 ⁵ =5.1 Log ₁₀

LEGENDA:

- V_c = numero colonie (ufc)/piastra
- N_v = conteggio medio in ufc/ml della sospensione batterica di convalida
- B = conteggio medio in ufc/ml nella convalida della non tossicità del neutralizzante
- C = conteggio medio in ufc/ml nella convalida della neutralizzazione
- N = conteggio medio in ufc/ml della sospensione batterica test
- N_a = conteggio medio in ufc/ml della campione test dopo il tempo di contatto
- R = riduzione della vitalità



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

REPORT EFFICACIA FUNGICIDA / FUNGICIDAL EFFICACY TEST

UNI EN 1650:2008

Disinfettanti chimici e antisettici.

Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività fungicida dei disinfettanti chimici ed antisettici in base alla norma.

Chemical disinfectants and antiseptics.

Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas

Metodo di prova e requisiti (Fase 2/ Stadio 1) /

Test method and requirements (phase 2, step 1)

Prodotto / product :

KILL PLUS

REPORT 03Nettuno/2015
Data: 05/11/2015

Committente / Customer:

NETTUNO SRL

Via Industria, 16/18

24060 CASELLI CALEPIO (BG) - Italy

INDICE / CONTENTS:		Pag. / Page
	DICHIARAZIONE DI CONFORMITÀ ALLE NORME DI BUONA PRATICA DI LABORATORIO / DECLARATION OF CONFORMITY TO STANDARDS OF GOOD LABORATORY PRACTICE	3
	INTRODUZIONE / FOREWORD	4
1	SCOPO / SCOPE	4
2	TERMINI E DEFINIZIONI / TERMS AND DEFINITIONS	5
3	CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE IN ESAME / IDENTIFICATION OF THE PRODUCT	6
4	CONDIZIONI SPERIMENTALI / EXPERIMENTAL CONDITIONS	7
	PARAMETRI SPERIMENTALI / EXPERIMENTAL PARAMETERS	7
4.1	MICROORGANISMI DI PROVA / TEST ORGANISMS	9
4.2	MATERIALI E REAGENTI / MATERIAL AND REAGENT	9
	Soluzioni e reagenti / <i>Culture media and reagents</i>	9
4.3	SOSTANZE INTERFERENTI / INTERFERING SUBSTANCES	11
4.4	APPARECCHIATURA E VETRERIA / USUAL MICROBIOLOGICAL LABORATORY EQUIPMENT	12
5	ESECUZIONE DEL SAGGIO / EXPERIMENTAL PROCEDURE	13
5.1	PROVE PRELIMINARI / PRELIMINARY TESTS	13
5.1.1	Preparazione delle sospensioni micotiche / <i>Fungal suspension</i>	13
5.1.2	Convalida del Metodo Diluizione-Neutralizzazione / <i>Dilution neutralization Method verification:</i>	15
5.1.3	Validazione condizioni sperimentali (A) / <i>Experimental conditions verification (A)</i>	16
5.1.4	Validazione non tossicità del neutralizzante (B) / <i>Neutralizer verification (B)</i>	16
5.1.5	Validità neutralizzazione (C) / <i>Neutralization verification (C)</i>	17
5.2	SAGGIO VERO E PROPRIO: TEST FUNGICIDA – TEST LIEVITICIDA / TEST METHOD: FUNGICIDAL TESTING – YEASTICIDAL TESTING	18
5.3	CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI / CALCULATION AND EXPRESSION OF RESULTS	19
5.4	VERIFICA DELLA METODOLOGIA DI CONVALIDA / VERIFICATION OF THE METHODOLOGY	22
6	RISULTATI / RESULTS	23
7	CONCLUSIONI / CONCLUSIONS	24
	APPENDICE 1 / ANNEX 1: Risultati / Results	25
	Tabella 1: Risultati in Condizione di pulito / <i>Table 1: Results clean condition</i>	
	Tabella 2: Risultati in Condizione di sporco / <i>Table 2: Results dirty condition</i>	



*in collaborazione con
prof. P.G.Balboni Università degli Studi
Sezione di Microbiologia*

**DICHIARAZIONE DI CONFORMITÀ ALLE NORME DI BUONA PRATICA DI
LABORATORIO /DECLARATION OF CONFORMITY TO STANDARDS OF GOOD
LABORATORY PRACTICE**

I metodi di prova in base alle UNI EN 1650:2008, eseguiti per la valutazione in sospensione dell'attività fungicida di prodotti, classificati come disinfettanti chimici ed antisettici, classificati come disinfettanti chimici ed antisettici in campo alimentare, industriale, domestico e nelle collettività, sono stati eseguiti rispettando le regole della Buona Prassi di laboratorio (BPL), comprendente un insieme di regole che garantiscono la qualità delle prove non cliniche sperimentali di laboratorio.

Ogni prova "*in vitro*" viene condotta secondo la Buona Prassi di Laboratorio in conformità alle regolamentazioni vigenti, concernenti il rispetto della sicurezza sul lavoro.

According to UNI EN 1650:2008 the method test for the evaluation in suspension of fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas or medical area, have been carried out following the rules of Good Laboratory Practice (GLP), comprising a set of rules that guarantee the quality of experimental test laboratory. Each test "in vitro" is carried out according to Good Laboratory Practice in accordance with existing regulations regarding the observation of safety at work.

Data: 05/11/2015 / November 05th 2015

(Responsabile scientifico Firma / Signature)

Prof. Pier Giorgio Balboni)
University Of Ferrara Dpt. Medicine
Prof. cultore della materia "Microbiologia"

INTRODUZIONE / FOREWORD

NORMA
EUROPEA /
EUROPEAN
STANDARD

UNI EN 1650:2008 Disinfettanti chimici ed antisettici. Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività fungicida dei disinfettanti chimici ed antisettici usati in campo alimentare, industriale, domestico e nelle collettività. Metodo di prova e requisiti (Fase 2/Stadio 1).

Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas. Test method and requirements (Phase 2, Step 1)

SCOPO / SCOPE

1

La NORMA EUROPEA EN 1650: luglio 2008: Disinfettanti chimici ed antisettici. Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività fungicida dei disinfettanti chimici ed antisettici usati in campo alimentare, industriale, domestico e nelle collettività. Metodo di prova e requisiti (Fase 2 / Stadio 1) è una norma europea applicata ai disinfettanti chimici ed antisettici e descrive un metodo di prova in sospensione per determinare se un disinfettante chimico o un antisettico, presenta o no un'attività fungicida nei campi di applicazione precedentemente indicate.

European Standard EN 1650 (July 2008) is a European standard applied to chemical disinfectants and antiseptics and determine the methods to evaluate the fungicidal efficacy of chemical disinfectants and antiseptics in the area described in the scope.

- 2 TERMINI E DEFINIZIONI / TERMS AND DEFINITIONS**
- 2.1 Prodotto (per disinfezione chimica e/o antisepsi):** Agente chimico, o formulazione chimica, usato come disinfettante chimico o antiseptico [EN 1040].
Product (for chemical disinfection and/or antiseptis): chemical agent or formulation used as a chemical disinfectant or antiseptic [EN 1040].
- 2.2 Fungicida:** Prodotto in grado di uccidere i funghi e le relative spore in condizioni definite [EN 1275].
Product which kills vegetative and the fungal spores under defined conditions. Adjective: Fungicidal.
- 2.3 Attività fungicida (EN 1650):** Capacità del prodotto di dare luogo ad una riduzione di almeno 10^4 nel numero di cellule vitali di lievito e di spore di muffa appartenenti rispettivamente alle specie di riferimento di *Candida albicans* e *Aspergillus niger* in condizioni definite dalla presente norma europea.

Fungicidal activity
capability of a product to produce at least a 10^4 reduction in the number of viable yeast cells and fungal spores belonging to reference strains of Candida albicans e Aspergillus niger under conditions defined by this European Standard.
- 2.4 Condizioni di pulito / Clean conditions:** Condizioni di presenza di livelli minimi di materie organiche e/o inorganiche.
Conditions of the presence of minimal levels of organic matter and / or inorganic.
- 2.5 Condizioni di sporco / Dirty conditions:** Condizioni di presenza di un significativo livello di materie organiche e/o inorganiche. /
Conditions of the presence of high levels of organic matter and / or inorganic.
- 2.6 ufc / cfu:** il numero di microrganismi contati in unità formanti colonie (unità vitali), cresciuti su piastre con terreno di coltura in agar. /
Colony forming units.

3 CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE IN ESAME / IDENTIFICATION OF THE PRODUCT:

Denominazione della formulazione in esame:

Name of the product: **KILL PLUS**

DITTA PRODUTTRICE / MANUFACTURER:

NETTUNO SRL

Via Industria, 16/18 - 24060 CASELLI CALEPIO (BG) – Italy

Descrizione del prodotto: Description of the product:

è un prodotto liquido pronto all'uso ad azione disinfettante. /
is a liquid ready to use disinfectant.

Condizioni di stoccaggio: Temperatura ambiente. / Storage conditions: Room temperature.

Composizione / Composition:

Active ingredients:

Didecyl dimethyl ammonium chloride

Benzalkonium chloride

Eccipienti e acqua deionizzata q.b. a 100 gr.

Data ricevimento campione: 30/09/2015

Periodo di Analisi:

Data inizio del test: 05/10/2015 ÷ Data fine test 20/10/2015.

Date of testing: 2015-10-05 End date test: 2015-10-20.

4 **CONDIZIONI SPERIMENTALI / EXPERIMENTAL CONDITIONS** **PARAMETRI SPERIMENTALI / EXPERIMENTALE PARAMETERS**

Temperatura test: è stato eseguito a $+^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. / *Test temperature:* $+20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Concentrazione test: / *Test concentration:*

- 80%
- 40%
- 20%

La concentrazione del prodotto di prova è stata di 1,25 volte la concentrazione d'uso, perché viene diluita al 80% durante la prova e la validazione del metodo.

La soluzione di prova, per i prodotti da diluire prima dell'uso, è stata preparata utilizzando acqua dura ottenendo tre diverse concentrazioni, in modo da includere una concentrazione attiva in grado di avere capacità battericida ed una concentrazione non attiva (corrispondente ad una concentrazione molto bassa in modo da non possedere una attività battericida), in base alle indicazioni della norma UNI EN 1650:2008 (Fase 2/ Stadio 1) per i prodotti da sottoporre prima dell'uso a diluizione.

According to the method of the UNI EN 1650:2008 (Phase 2 / Step 1) the concentration of the test product was 1,25 times the desired test concentration because it is diluted to 80 % during the test and the method validation.

The test dilution for products to be diluted before use, was prepared in hard water at a minimum of three different concentrations to include one concentration in the active range active, corresponding to the concentration capable of have a bactericidal activity, and one concentration in the non-active range, corresponding to the concentration not active capable of not have a bactericidal activity.

Tempo di contatto:

- 10 minuti

4.1 MICRORGANISMI TEST/ TEST ORGANISMS

Microrganismi: *Test organisms*

sono stati utilizzate cellule vegetative di *Candida albicans* e spore di *Aspergillus niger* dei seguenti miceti:

LIEVITO / YEAST:

- *Candida albicans* ATCC 10231*;

MUFFE / MOLDS:

- *Aspergillus niger* ATCC 16404*.

*ATCC (American Type Culture Collections).

The fungicidal activity shall be evaluated using the following two test organisms:

–*Candida albicans* (vegetative cells);

–*Aspergillus niger* (spores).

4.2 MATERIALI E REAGENTI / REAGENTS AND MATERIAL

TERRENO DI COLTURA / MEDIA

I reagenti devono essere puri per analisi e/o adatti per applicazioni microbiologiche.

Agar – estratto di malto (Malt Extract Agar: MEA)

MEA è stato utilizzato per la conservazione dei ceppi fungini e per la determinazione della conta delle unità vitali. Composizione:

Maltosio 30,0 g; peptone di soia (peptocomplex) 3,0 g; Destrina 2,5 gr, glicerolo 1,0 g and agar 15,0 g in 1000 ml in acqua distillata esente da pirogeni. Sterilizzazione in autoclave.

Controllo del pH a $5,6 \pm 0,2$ a 20 ± 1 °C.

Malt extract agar (MEA) is used for counting of viable fungi and yeast strains, consisting of: Malt extract 30,0 g; Soya peptone (peptocomplex) 3,0 g; Dextrin 2,5 g; Glycerol 1,0 g and Agar 15,0 g in 1000 ml distilled water

Sterilize in the autoclave. pH control at $5,6 \pm 0,2$ at 20 ± 1 °C.

Diluente / Diluent

Soluzione di cloruro di sodio triptone costituita da:

NaCl 8,5 g; Triptone, digestione pancreatica di caseina 1,0 g in 1000 ml in acqua distillata esente da pirogeni.

Controllo del pH = $7,0 \pm 0,2$ a 20 °C. Sterilizzazione in autoclave.

Tryptone sodium chloride solution, consisting of:

Sodium chloride (NaCl) 8,5 g; Tryptone, pancreatic digest of casein 1,0 g g in 1000 ml

distilled water pyrogens free. pH control at $7,0 \pm 0,2$ at 20 ± 1 °C. Sterilize in the autoclave.

Neutralizzante / Neutralizer

Il neutralizzante è stato validato per il prodotto sottoposto a prova.

Composizione:

Lecitina 10 g/l

Polisorbato 80 50 g/l

Tiosolfato di sodio 10 g/l

Catalasi 0,25 g/l

Tampone fosfato 0,0025 ml/l g/l

Acqua distillata a 1000 ml. Il pH a $7,0 \pm 0,2$ a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Sterilizzazione in autoclave

The neutralizer has been validated for the test product being tested.

Composition:

Lecithin , 10 g/l.

Polysorbate 80 50 g/l

Sodium thiosulphae, 10 g/l

Catalase 0,25g/l

Phosphate buffer 0.0025 ml / l

Distilled water to 1000 ml. pH control at $7,0 \pm 0,2$ AT $20^\circ \pm 1$ C. Sterilize in the autoclave.

Acqua dura per la diluizione del prodotto nella preparazione del campione /

Hard water for dilution of products

L'acqua dura utilizzata per la diluizione dei prodotti è stata preparata nel modo seguente:

- 600 ml di soluzione A [composizione: dissolvere 19,84 g di MgCl_2 anidro e 46,24 g di CaCl_2 anidro in 1000 ml di acqua distillata] e

- 700 ml di soluzione B [composizione: dissolvere 35,02 g di NaHCO_3 in 1000 ml di acqua distillata] miscelare e diluire fino a 1000 ml con acqua distillata.

Controllo del pH a $7,0 \pm 0,2$ a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Sterilizzazione per filtrazione con un filtro con pori di $0,45 \mu\text{m}$ di diametro.

For the preparation of 1 000 ml of hard water, the procedure is as follows:

-600 ml solution A [composition: dissolve 19,84 g magnesium chloride (MgCl_2) and 46,24 g calcium chloride (CaCl_2) in 1000 ml distilled water] and

-700 ml solution B [composition: dissolve 35,02 g sodium bicarbonate (NaHCO_3) in 1000 ml distilled water] mix and dilute to 1000 ml with distilled water.

pH control at $7,0 \pm 0,2$ at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Sterilize by membrane filtration with a membrane of $0,45 \mu\text{m}$ pore size diameter.

4.3 SOSTANZE INTERFERENTI / INTERFERING SUBSTANCES: *interfering proteins*

La sostanza interferente ha lo scopo di simulare la presenza di sostanza organica.

- **Condizioni di pulito:** 0,3 g/l di albumina bovina [0,03% BSA] (Sigma);

Albumina bovina frazione V 0,03 g SIGMA
 Acqua distillata fino a 100 ml
 Dissolvere 0,03 g di albumina bovina frazione V (idonea per metodi di microbiologia) in 97 ml di acqua distillata. Sterilizzazione per filtrazione su membrana.
 La concentrazione finale della albumina bovina è stata pari a 0,3 g / l.

- **Condizioni di sporco:** 3 g/l di albumina bovina (Sigma) [0,3% BSA]

a) BSA 3 gr/l
 Albumina bovina frazione V 0,3 g SIGMA
 Acqua distillata fino a 100 ml
 Dissolvere 0,3 g di albumina bovina frazione V (idonea per metodi di microbiologia) in 97 ml di acqua distillata. Sterilizzazione per filtrazione su membrana.

Il campione in esame non ha determinato la formazione di precipitati o fenomeni di flocculazione durante l'aggiunta di sostanze interferenti.

- *Clean conditions: bovine albumin solution (BSA) – low concentration: 0,03%:*

*BSA 0,03 g
 Distilled water to 100 ml
 Dissolve 0,03 g of bovine albumin fraction V (suitable for microbiological purposes) in 97 ml of water. Sterilization by membrane filtration.
 The final concentration of the bovine albumin was equal at 0,3 g/l.*

- *Dirty condition: BSA – high concentration 0,3%:*

*BSA 0,3 g
 Distilled water to 100 ml
 Dissolve 0,3 g of bovine albumin fraction V (suitable for microbiological purposes) in 97 ml of water. Sterilization by membrane filtration.
 The final concentration of bovine albumin was equal at 3 g/l.*

The product test solutions were prepared freshly and used in the test within 2 h. They were give a physically homogeneous preparation that is stable during the whole procedure and not formation of a precipitate or flocculent through the addition of the interfering substance.

4.4 APPARECCHIATURA E VETTERIA / APPARATUS AND GLASSWARE

- ✓ Autoclave a 121 °C per un tempo minimo di 15 min ad 1 atm /
Apparatus for sterilisation: an autoclave capable of being maintained at 121°C for a minimum holding time of 15 min.
- ✓ Bagnomaria termostato regolabile a diverse temperature tra 20°C ± 1 °C e 45°C ± 1 °C /
Water baths: capable of being controlled at 20°C ±1 °C and at 45°C ±1 °C
- ✓ Incubatore alla temperatura di 30 °C ± 1 °C.
Incubator: capable of being controlled either at 30 ±1 °C.
- ✓ pH-metro accuratezza di taratura di ± 0,1 unità di pH a 25 °C. /
pH-meter, having an accuracy of calibration of 0,1 pH units at 25°C.
- ✓ Cronometro / *Stopwatch.*
- ✓ Cappa a flusso laminare vertical Biohazard Classe II / *Biological safety cabinet with AirClean Systems Vertical Laminar Flow - "BioHazard" class II.*
- ✓ Agitatore Vortex® / *Electromechanical agitator: Vortex mixer.*
- ✓ Apparato di filtrazione con membrane filtranti aventi pori di diametro di 0,45 µm. /
Apparatus filtration with membrane filters of 0,45 µm pore size diameter
- ✓ Materiale monouso (provette; pipette in plastica graduate di capacità nominali 10 ml, 1 ml e 0,1 ml; Piatte Petri diametro 90 mm). /
Disposable material (tubes; graduated pipettes of nominal capacities 10 ml, 1 ml and 0,1 ml; Petri plates dishes of size 90 mm diameter).
- ✓ Microsfere di vetro (diametro: tra 3 mm e 4 mm) sterilizzate in autoclave /
Glass beads (Diameter: 3 mm to 4 mm) sterilized in an autoclave.

5 ESECUZIONE DEL SAGGIO / TEST METHOD

5.1 PROVE PRELIMINARE / PRELIMINARY TEST

5.1.1 PREPARAZIONE DELLE SOSPENSIONI FUNGINE (cellule vegetative per i lieviti e spore per la muffa *Aspergillus*) DI PROVA

I ceppi dei lieviti, *Candida albicans* ATCC sono stati sottoposti a 2 subcolture di seguito su slant di MEA e incubate a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 48 h e 96 h per ottenere la sospensione di lievito di prova.

Il ceppo *Aspergillus niger* è stato coltivato su MEA in piastre Petri ed dopo incubazione a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 72 h ÷ 120 h.

La procedura per preparare la sospensione test di *Aspergillus niger* è la seguente:

- a) sono state prelevate le conidiospore dalla superficie della coltura in MEA e sospesa in 10 ml di soluzione sterile di 0,05% p/V di polisorbato 80 in acqua con 5 g di microsferi di vetro. Dopo agitazione di 1 min la sospensione è stata filtrata con un filtro di vetro poroso sinterizzato
- b) è stato effettuato l'esame microscopico a 400 ingrandimenti, per evidenziare l'assenza di frammenti di micelio e di spore in germinazione.

Ogni sospensione di prova (lievito e muffa) è stata diluita con diluizioni seriali fino ad ottenere una concentrazione compresa tra $1,5 \times 10^7$ e $5,0 \times 10^7$ ufc (unità formanti colonia)/ml. Per il conteggio delle sospensioni fungine di prova sono state preparate delle diluizioni decimali seriali con il diluente da 10^{-5} fino a 10^{-6} . Dopo miscelazione è stato prelevato 1 ml, in doppio, da ogni diluizione ed è stato effettuato un conteggio per inclusione in 15 ml di MEA sciolto e raffreddato a $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Condizioni di incubazione: le piastre MEA sono state incubate a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$:

- *Candida albicans*: per 48 h ÷ 96 h.
- *Aspergillus niger*: per 72 h ÷ 120 h.

Dopo incubazione è stato quindi determinato il numero (V_c = numero di colonie/piastra) di unità formanti colonia/ml per ciascuna piastra ed è stato poi calcolato il valore della sospensione di prova (**N**).

Working culture of test organisms

FUNGAL PREPARATION OF SUSPENSION (for *Candida albicans* vegetative cells and for *Aspergillus niger* spores) (“N”).

***Candida albicans* (yeast)**

In order to prepare the working culture of *Candida albicans*, prepared two subcultures from the stock culture by streaking onto MEA slopes and incubate at $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ for 48 h to 96 h.

***Aspergillus niger* (mold)**

For *Aspergillus niger*, use only the first subculture grown on MEA in Petri plates and incubate at $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ for 72 h ÷ 120 h.

The procedure for preparing the *Aspergillus niger* test suspension is as follows.

- a) Take the working culture and suspend the spores in 10 ml of sterile 0,05 % (w/v) polysorbate 80 solution in water. Using a glass rod or spatula, detach the conidiospores from the culture surface. Transfer the suspension into a flask and gently shake by hand for one minute together with 5 g of glass beads. Filter the suspension through a fritted filter.
- b) Carry out a microscopic examination under $\times 400$ magnification immediately after the preparation and just before the test, to show the absence of mycelia fragments and spore germination. The conidiospores are washed at least twice by resuspension in diluent and subsequent centrifugation.

Each test suspension (yeast and mold) was diluted with serial dilutions to adjust the number of cells in the suspension to $1,5 \times 10^7$ cfu/ml to $5,0 \times 10^7$ cfu/ml using diluent, estimating the number of cfu by any suitable means.

For counting, prepare 10^{-5} and 10^{-6} dilutions of the test suspension using diluent. Mix. Take a sample of 1,0 ml of each dilution in duplicate and inoculate using the pour plate technique, transfer each 1,0 ml sample into separate Petri dishes and add 15 ml melted MEA, cooled to $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Incubation: MEA plates were incubated at $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$:

- *Candida albicans*: ÷ 96 h to 48 h.
- *Aspergillus niger*: for 72 h to 120 h.

After incubation count the cfu on the plates to determine the total number of (V_c = number of colonies / plate) colony forming units (cfu) / ml for each plate.

Calculate the numbers of cfu/ml in the fungal (yeast and fungi) stock suspension N .

5.1.2 CONVALIDA DEL METODO DI DILUIZIONE-NEUTRALIZZAZIONE / DILUTION-NEUTRALIZATION METHOD VERIFICATION

La prova di convalida è stata effettuata contemporaneamente al procedimento di prova utilizzando solo la più alta concentrazione di prodotto e condizioni (sospensione fungina di prova, soluzione di prova del prodotto, neutralizzante o liquido di lavaggio, sostanze interferenti, acqua dura) identiche a quelle utilizzate nella prova.

The test and the control and validation procedures was carried out in parallel and separately for each experimental condition.

5.1.2.1 PREPARAZIONE DELLA SOSPENSIONE FUNGINA DI CONVALIDA (N_V)

Diluire ogni sospensione fungina di prova con il diluente in modo da ottenere tra 3×10^2 e $1,6 \times 10^3$ ufc/ml. Per il conteggio è stata preparata una diluizione 10^{-1} con il diluente e, dopo agitazione, è stato prelevato, in doppio, 1 ml e posto in piastre Petri per effettuare un conteggio per inclusione in MEA (separatamente per *Candida albicans* e per *Aspergillus niger*).

Dopo incubazione è stato, quindi, determinato il numero (V_c = numero di colonie/piastra) di unità formanti colonie/piastra per ogni diluizione, calcolando il valore in ufc/ml della sospensione fungina (N_V).

VALIDATION SUSPENSION (“ N_V ”)

To prepare the validation suspension, dilute each fungal test suspension with the diluents to obtain the fungal count of $3,0 \times 10^2$ cfu/ml to $1,6 \times 10^3$ cfu/ml.

*For counting, prepare a 10^{-1} dilution with diluent. Mix. Take a sample of 1,0 ml in duplicate and inoculate using the pour plate technique in MEA (separately for *Candida albicans* and for *Aspergillus niger*).*

After incubation count the cfu on the plates to determine the total number of cfu.

Calculate the numbers of cfu/ml in the validation suspension “ N_V ”.

5.1.2.2

CONVALIDA DELLE CONDIZIONI SPERIMENTALI SCELTE (VERIFICA DELL'ASSENZA DI EFFETTI LETALI O INIBITORI NELLE CONDIZIONI DI PROVA) (A)

In una provetta 1 ml della sostanza interferente è stato mescolato a 1 ml della sospensione di prova fungina contenente da 3×10^2 ucf/ml a $1,6 \times 10^3$ ucf/ml. Dopo 2 min. \pm 10 s a $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ sono stati aggiunti 8,0 ml di acqua dura. Dopo agitazione e, dopo il tempo di contatto e la temperatura previsti dal test (10 minuti a 20°C), è stato prelevato 1 ml, in doppio, e posto in piastre Petri in inclusione in MEA.

Dopo incubazione è stato, quindi, determinato il numero di colonie espresse in cfu/ml (A).

EXPERIMENTAL CONDITIONS CONTROL "A" – VALIDATION OF THE SELECTED EXPERIMENTAL CONDITIONS AND/OR VERIFICATION OF THE ABSENCE OF ANY LETHAL EFFECT IN THE TEST CONDITIONS

To validate the selected experimental conditions and/or verify the absence of any lethal effect in the test conditions, the procedure is as follows.

a) Pipette 1,0 ml of the interfering substance used in the test into a tube. Add 1,0 ml of the validation suspension. Start the stopwatch immediately, mix and place the tube at $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$.

At the end of this time, add 8,0 ml of hard water . Restart the stopwatch at the beginning of the addition. Mix and place the tube in a water bath controlled at $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for test contact time t (10 minutes). Just before the end of t , mix again.

b) At the end of t , take a sample of 1,0 ml of this mixture "A" in duplicate and inoculate using the pour plate technique . After incubation and counting calculate the numbers of cfu/ml in the validation suspension "A".

5.1.2.3 CONVALIDA DELLA NON TOSSICITÀ DEL NEUTRALIZZANTE (B) /

1,0 ml di acqua è stato addizionato a 8,0 ml di neutralizzante e aggiunto 1,0 ml di sospensione fungina da 3×10^2 ucf/ml a $1,6 \times 10^3$ ucf/ml. Dopo agitazione e dopo 5 min. ± 10 s di tempo di contatto a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ è stato prelevato 1 ml , in doppio, dalla miscela ottenuta e posto in piastre Petri in inclusione in MEA.

Dopo incubazione è stato quindi determinato il numero di colonie espresse in cfu/ml (B).

NEUTRALIZER CONTROL "B" – VERIFICATION OF THE ABSENCE OF TOXICITY OF THE NEUTRALIZER

To verify the absence of toxicity of the neutralizer, the procedure is as follows.

a) Pipette 8,0 ml of the neutralizer – used in the test — and 1,0 ml of water into a tube. Add 1,0 ml of the validation suspension . Start the stopwatch at the beginning of the addition, mix, and place the tube in a water bath controlled at $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$. Just before the end of this time, mix .

c) At the end of this time, take a sample of 1,0 ml of this mixture "B" in duplicate and inoculate using the pour plate technique. After incubation and counting Calculate the numbers of cfu/ml in the validation suspension "B".

5.1.2.4 CONVALIDA DELLA NEUTRALIZZAZIONE (C)

1,0 ml di sostanza interferente è stato addizionato a 1,0 ml di acqua dura (utilizzata come diluente) e a 8,0 ml di soluzione test preparata del prodotto in esame. Dopo agitazione e, dopo il tempo di contatto e alla temperatura previsti dal test (15 minuti a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), è stato prelevato 1,0 ml della miscela e trasferito in una provetta contenente 8,0 di neutralizzante, previamente mantenuto a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. La miscela è stata lasciata a contatto 5 min. ± 10 s a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ed è stato aggiunto 1,0 ml di sospensione fungina contenente da 3×10^2 ucf/ml a $1,6 \times 10^3$ ufc/ml, agitato con il Vortex e dopo 30 min ± 1 min. di contatto a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Dopo agitazione è stato prelevato 1 ml, in doppio, dalla miscela ottenuta e posto in piastre Petri in inclusione in MEA.

Dopo incubazione è stato quindi determinato il numero di colonie espresse in cfu/ml (C).

METHOD VALIDATION "C" – DILUTION-NEUTRALIZATION VALIDATION

To validate the dilution neutralization method, the procedure is as follows.

a) Pipette 1,0 ml of the interfering substance used in the test into a tube. add 1,0 ml of the diluent and then, starting a stopwatch, add 8,0 ml of the product test solution only of the highest concentration used in the test. mix and place the tube in a water bath controlled at 20°C for t (test time contact: 15 minutes). just before the end of t , mix again.

b) At the end of t transfer 1,0 ml of the mixture into a tube containing 8,0 ml of neutralizer. restart the stopwatch immediately at the beginning of the addition. mix and place the tube in a water bath controlled at $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 5 min ± 10 s. add 1,0 ml of the validation suspension.

Start a stopwatch at the beginning of the addition and mix. place the tube at $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 30 min ± 1 min. just before the end of this time, mix again. at the end of this time, take a sample of 1,0 ml of the mixture "C" in duplicate and inoculate using the pour plate technique. After incubation and counting calculate the numbers of cfu/ml in the validation suspension "C".

5.2 ESECUZIONE DEL SAGGIO (Na) : METODO DILUIZIONE – NEUTRALIZZAZIONE

Per ogni ceppo fungino e per ogni concentrazione del campione in esame è stata allestita una provetta contenente 1 ml di sostanza interferente e 1 ml di *sospensione fungina di prova* avente una concentrazione tra $1,5 \times 10^7$ e $5,0 \times 10^7$ ufc/ml, alla temperatura prevista dal test di $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ per $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$. Dopo mescolamento sono stati aggiunti 8,0 ml di soluzione del prodotto in esame e dopo agitazione lasciati a contatto per il tempo di contatto stabilito di $10 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ e alla temperatura di esecuzione del test di $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Terminato il tempo di contatto, è stato prelevato, in doppio, 1 ml di miscela test e sono stati aggiunti 8,0 ml di neutralizzante e 1,0 ml di acqua. Dopo il tempo di neutralizzazione di $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$, la miscela è stata diluita con diluente con diluizioni decimali seriali da 10^{-1} fino a 10^{-3} . È stato prelevato 1 ml, in doppio, dalla miscela e dalle sue diluizioni e posto in piastre Petri per effettuare un conteggio per inclusione in MEA. In parallelo lo stesso procedimento è stato ripetuto sostituendo la sostanza in esame con il diluente.

Condizioni di incubazione: le piastre MEA sono state incubate a $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$:

- *Candida albicans*: per $48 \text{ h} \div 72 \text{ h}$.

- *Aspergillus niger*: per $72 \text{ h} \div 120 \text{ h}$.

Dopo incubazione è stato quindi determinato il numero (Vc) di unità formanti colonie/piastra per ogni diluizione, calcolando il valore della miscela di prova (Na).

TEST "Na" – DETERMINATION OF FUNGICIDAL ACTIVITY DILUTION-NEUTRALIZATION METHOD

The procedure for determining fungicidal and yeasticidal concentrations is as follows.

a) Pipette 1,0 ml of the interfering substance into a tube. Add 1,0 ml of the test suspension. Start the stopwatch immediately, mix and place the tube at the chosen test temperature $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$.

At the end of this time, add 8,0 ml of one of the product test solutions. Restart the stopwatch at the beginning of the addition. Mix and place the tube at $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for the chosen contact time t (10 minutes at $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$). Just before the end of t , mix again.

b) At the end of t , take a 1,0 ml sample of the test mixture "Na" and transfer into a tube containing 8,0 ml neutralizer and 1,0 ml water. Mix and place in a water bath controlled at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. After a neutralization time of $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$, mix and immediately take a sample of 1,0 ml of the neutralized test mixture "Na" (containing neutralizer, product test solution, interfering substance and test suspension) in duplicate and inoculate using the pour plate technique.

1) Pour plate technique, pipette each 1,0 ml sample into separate Petri dishes and add 15 ml of melted MEA, cooled to $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$. Incubation and counting.

Calculate the numbers of cfu/ml in the fungal (yeast and fungi) test mixture "Na".

5.3 CALCOLO DEI RISULTATI / CALCULATION OF THE RESULTS

5.3.1 CALCOLO DELLE UNITÀ VITALI (UFC/ML) /

TOTAL VIABLE COUNT CALCULATION (CFU / ml) : Vc values: All experimental data are reported as Vc values: in the dilution-neutralization method (test and controls), a Vc value is the number of colony-forming units counted per 1,0 ml sample.

Il conteggio è stato effettuato usando il numero delle colonie contate su entrambe le piastre. Solo le piastre, contenenti da 15 a 300 colonie per i lieviti e da 15 a 150 per le muffe, sono state usate per il calcolo dei risultati. È accettata la deviazione standard del 10% pari rispettivamente al numero di colonie di 14 e 330 per i lieviti e 14 e 165 per le muffe. Nelle piastre dove il numero di colonie su tutte le piastre contate era maggiore di 330 (per i lieviti) e di 165 (per le muffe) è stato registrato il numero di ufc/ml come >330 (per i lieviti) e come >165 (per le muffe).

Count the plates and determine the number of cfu for each plate. Only the plates containing from 15 to 300 colonies (for yeast) and 15 to 150 (for molds) were used for the calculation of the results.

It is accepted standard deviation of 10% equal to the number of colonies of 14 and 330 (for yeast) and 14 and 165 (for molds). In the plates where the number of colonies counted on all plates was greater than 330 (for yeast) and 165 (for molds) was recorded the number of cfu / ml as > 330 (for yeasts) and as > 165 (for molds).

Sospensione micotica test N e N₀ / Calculation of N and N₀

Il calcolo della conta totale viene effettuato nel seguente modo:

Since two dilutions of the test suspension are evaluated, calculate the number of cfu/ml as the weighted mean count using the following equation:

$$N(\text{ufc} / \text{ml}) = \frac{c}{(n1 + 0,1n2)d}$$

Dove:

N = numero di cellule per ml in sospensione di prova

c = somma delle colonie contate su entrambe le piastre

n1 = numero delle piastre contate della più bassa diluizione (10⁻⁵)

n2 = numero delle piastre contate della più alta diluizione (10⁻⁶)

d = fattore di diluizione

where:

N is the number of cells per ml in the test suspension.

c is the sum of Vc values taken into account;

n1 is the number of Vc values taken into account in the lower dilution;

n2 is the number of Vc values taken into account in the higher dilution;

d is the dilution factor

Saggio vero e proprio N_a e saggio preliminare N_v / Calculation of N_a and N_v

Per il saggio vero e proprio (N_a) e per il saggio preliminare (N_v) il calcolo della conta totale viene effettuato nel seguente modo:

Calculate N_a using the following equation:

$$(N_a) \text{ ufc / ml} = \frac{10 c}{n}$$

Dove:

N_a = numero di sopravvissuti per ml nella miscela test alla fine del tempo di contatto e prima della neutralizzazione.

N_v = numero di cellule per ml nella sospensione convalida

c = somma delle colonie contate su entrambe le piastre

n = numero delle piastre contate

Where:

N_a is the number of survivors per ml in the test mixture at the end of the contact time and before neutralization.

N_v is the number of cells per ml in the validation suspension.

c is the sum of V_c values taken into account;

n is the number of V_c values taken into account.

Saggio preliminare A, B, C e N_{v0} / Calculation of A, B, C and N_{v0}

Per il saggio preliminare (A, B, C e N_{v0}) il calcolo della conta fungina viene effettuato nel seguente modo:

Calculate using the following equations:

$$A, B, C \text{ e } N_{v0} = c/n$$

Dove:

N_{v0} = numero di cellule per ml nelle miscele "A", "B" and "C" all'inizio del tempo di contatto (tempo 0).

c = somma delle colonie contate su entrambe le piastre

n = numero delle piastre contate

Where:

N_{v0} is the number of cells per ml in the mixtures "A", "B" and "C" at the beginning of the contact time (time 0).

c is the sum of V_c values taken into account;

n is the number of V_c values taken into account.

5.3.2 CALCOLO DELLA RIDUZIONE DELLA VITALITÀ / REDUCTION

Per ciascun microrganismo di prova e concentrazione di prova del prodotto è stato calcolato la riduzione delle cellule vive nel seguente modo:

$$R = \frac{N0}{Na}$$

Dove

R = riduzione della vitalità

$N0$ = conta fungina della sospensione di prova per ml all'inizio del tempo di contatto (tempo 0) ($N/10$).

Na = conta fungina della miscela test al termine del tempo di contatto

Were:

The reduction ($R = N0/Na$) is expressed in logarithm.

For each test organism record the number of cfu/ml in the test suspension N and the test Na . Calculate $N0$.

For each product concentration and each experimental condition, calculate and record the decimal log reduction (lg) separately using the equation:

$$lgR = lgN0 - lgNa$$

5.3.3 EFFICACIA FUNGICIDA / FUNGICIDAL ACTIVITY

Il prodotto di prova è considerato **FUNGICIDA** quando, per ogni ceppo fungino (lievito e muffe), a 20°C dopo il tempo di contatto preso in esame, provoca una riduzione della vitalità di almeno 10^4 , corrispondenti a una riduzione pari 4 logaritmi (99,99%) in base alle condizioni standard obbligatorie della norme UNI EN 1650:2008.

FUNGICIDAL ACTIVITY

According to UNI EN 1650:2008 standard under the obligatory test conditions the test product is considered FUNGICIDE when, for each fungal strain (yeasts and molds), at 20 ° C after the contact time taken into consideration, resulting at least a 4 lg reduction of vitality, corresponding to a reduction of 4 logarithms (99.99%).

5.4 VERIFICA DELLA METODOLOGIA DI CONVALIDA

Per ogni microrganismo di prova verificare che vengano rispettati i seguenti parametri di validazione:

Parametri di validazione:

- a) N compresa tra $1,5 \times 10^7$ cfu/ml e $5,0 \times 10^7$ cfu/ml ($7,17 \leq \lg N \leq 7,70$)
 N_0 compreso tra $1,5 \times 10^6$ e $5,0 \times 10^6$ ($6,17 \leq \lg N \leq 6,70$)
- b) N_{v0} compreso tra $3,0 \times 10^1$ e $1,6 \times 10^2$ ($1,47 \leq \lg N_{v0} \leq 2,20$)
 N_v compreso tra $3,0 \times 10^2$ e $1,6 \times 10^3$ ($2,47 \leq \lg N_v \leq 3,20$)
- c) A, B, C sia maggiore o uguale a 0.5 volte N_{v0}
- d) Valore medio delle conte di 2 successive diluizioni deve essere compreso tra 5 e 15.

Dove:

N: conteggio in ufc/ml della sospensione fungina;

N_v: conteggio in ufc/ml della sospensione fungina nel saggio preliminare;

A: conteggio in ufc/ml della soluzione di verifica delle condizioni sperimentali;

B: conteggio in ufc/ml per il controllo della tossicità del neutralizzante;

C: conteggio in ufc/ml dell'efficacia del neutralizzante.

VERIFICATION OF METHODOLOGY

For each test organism check that:

a) N is between $1,5 \times 10^7$ and $5,0 \times 10^7$ ($7,17 \leq \lg N \leq 7,70$)

N_0 is between $1,5 \times 10^6$ and $5,0 \times 10^6$ ($6,17 \leq \lg N_0 \leq 6,70$)

b) N_{v0} is between 30 and 160 ($3,0 \times 10^1$ and $1,6 \times 10^2$)

(N_v is between $3,0 \times 10^2$ and $1,6 \times 10^3$)

c) A, B, C are equal to or greater than $0,5 \cdot N_{v0}$.

d) control of weighted mean counts: quotient is not lower than 5 and not higher than 15.

Where:

N is the number of cfu/ml of the fungal test suspension;

N_v is the number of cfu/ml of the fungal suspension ;

A is the number of cfu/ml of the experimental conditions validation .

B is the number of cfu/ml of the neutralizer toxicity validation;

C is the number of cfu/ml of the dilution-neutralization validation;

6 RISULTATI DEL SAGGIO VERO E PROPRIO / TEST METHOD RESULTS

I valori di riduzione di vitalità (R) che dimostrano l'attività fungicida secondo il METODO DI PROVA QUANTITATIVO IN SOSPENSIONE UNI EN 1650:2008 (Fase 2 / Stadio 1) del prodotto in esame sono riportati nelle tabelle seguenti:

According to the test suspension EN 1650:2008 (Phase 2 / Step 1) the reduction of viability (R) of the test product shows fungicidal activity as shown in the following table:

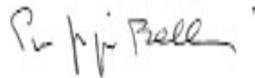
Prodotto test: KILL PLUS – NETTUNO S.r.l.	SOSPENSIONE MICETICA DI PROVA / <i>FUNGAL TEST SUSPENSION</i> (N₀) Log₁₀	RIDUZIONE MICETICA / FUNGAL REDUCTION					
		Sostanza interferente / <i>Interfering substances</i>					
<i>Microorganismi Test Test Organisms</i>		<i>CLEAN CONDITION:</i> Sostanza interferente / <i>Interfering substances</i> 0,3 gr/l BSA			<i>DIRTY CONDITION:</i> Sostanza interferente / <i>Interfering substances</i> 3 gr/l BSA		
		TEMPO DI CONTATTO 10 min					
		TEMPERATURA 20° C					
		20%	40%	80%	20%	40%	80%
		Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	6,30	<2,48	3,00	>4,16 Efficacy	<2,48	2,99	>4,05 Efficacy
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404.	6,19	<2,37	2,96	>4,06 Efficacy	<2,37	2,82	>4,00 Efficacy

7 CONCLUSIONI / CONCLUSIONS

Sulla base dei risultati ottenuti, rispettati i criteri di validità del saggio, la soluzione in esame **KILL PLUS – NETTUNO S.r.l.** è risultata **FUNGICIDA**, dopo il tempo di contatto di 10 minuti a 20°C, in condizioni di pulito (0,3 gr/l albumina bovina) ed in condizioni di sporco (3 gr/l albumina bovina), nei confronti di *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* ATCC 16404, secondo quanto previsto dalla norma UNI EN 1650:2008 – Fase 2 / Stadio 1.

*According to EN 1650:2008 (Phase 2 / Stage 1), the product **KILL PLUS – NETTUNO S.r.l.**, possesses **FUNGICIDAL ACTIVITY**, in 10 minutes at 20°C, under clean condition (0,3 gr/l bovine albumin) and under dirty condition (3 gr/l bovine albumin), for referenced strains *Candida albicans* ATCC 10231 and *Aspergillus niger* ATCC 16404.*

Data: 05/11/2015 / November 05th 2015



(Responsabile scientifico Firma / Signature
Prof. Pier Giorgio Balboni)
University Of Ferrara Dpt. Medicine
Prof. cultore della materia "Microbiologia"

APPENDICE 1: Risultati

RISULTATI TEST (PROVA EFFICACIA FUNGICIDA IN SOSPENSIONE)
Test results (fungicidal suspension test) EN 1650:2008 (Fase 2, stadio 1 / Phase 2, step1)

Nome Prodotto / Product-name: **KILL PLUS**

Produttore / Manufacturer:

NETTUNO SRL Via Industria, 16/18 - 24060 CASELLI CALEPIO (BG) - Italy

Concentrazione d'uso: pronto all'uso.

Condizioni di stoccaggio: Conservare in luogo fresco e asciutto / *Storage conditions: Store in a cool dry place.*Concentrazione test: 80%, 40%, 20% in acqua. *Test Concentration: 80%, 40%, 20% on water.*Nessun precipitato durante la procedura di analisi / *No precipitate during the test procedure (test mixture is homoneneous).*Metodo Neutralizzazione – Diluizione / Metodo in inclusione in piastra/ *Dilution neutralization method /**Inclusion on MEA on plate Petri method;* Numero di piastre / *Number of plates* 1 / ml (2 / diluizione / *dilution*)Neutralizzante / *Neutralizer:* . 30 g/l polysorbate 80; lecithin 3 g/ ; saponin 30 g/l; L-histidine 1 g/l in diluent.

Test temperature: 20°C.

Test organism: *Candida albicans* ATCC 10231.

Incubation temperature: 30°C

Data fine analisi: 20/10/2015.

End date test: 2015-10-20.

<i>Candida albicans</i> ATCC 10231			CLEAN CONDITION Interfering substances: <i>BSA 0,3 g/l bovine serum albumin</i>								
Validation suspension (Nv_o)			Experimental Conditions control (A)			Neutralizer control (B)			Method validation (C)		
V_{C1}	148 (73 + 76)	$X = 154$	V_{C1}	122 (64 + 58)	$X = 126$	V_{C1}	132 (67 + 65)	$X = 128$	V_{C1}	90 (46 + 44)	$X = 94$
V_{C2}	160 (85 + 75)		V_{C2}	130 (68 + 62)		V_{C2}	124 (62 + 64)		V_{C2}	98 (43 + 47)	
$30 \leq X \text{ of } Nv_o \leq 160$ The test is VALID			$x \text{ of } A \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID			$x \text{ of } B \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID			$x \text{ of } C \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID		

Test suspension	Test Suspension (N):	N	V_{C1}	V_{C2}	$X \text{ wm} = 202 \times 10^5$; $\lg N = 7,30$ $N_{\theta} = N/10$; $\lg N = 6,30$ $6,17 \leq \lg N \leq 6,70 \Rightarrow$ The test is VALID <i>*used for calculation</i>
		10^{-5}	205*	200*	
		10^{-6}	45	40	

Results <i>Na</i>	Conc. of the product %	V_{C1}	V_{C2}	$\lg Na = X \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_{\theta} = 6,30$)	Contact Time (min)
	20%	>660	>660	>6600	>3,82	<2,48	10 min
	40%	150	170	1600	3,30	3,00	10 min
	80%	12	14	<140	2,14	4,16	10 min

Legenda / Explanation:

 V_C = count per ml (one plate duplicate) X = average of V_{C1} and V_{C2} (1 + 2 duplicate) $X \text{ wm}$ = weighted mean of X R = reduction ($\lg R = \lg N_{\theta} - \lg Na$)

<i>Candida albicans</i> ATCC 10231			<i>DIRTY CONDITION: Interfering substances: BSA 3 g/l bovine serum albumin</i>								
Validation suspension (Nv_o)			Experimental Conditions control (A)			Neutralizer control (B)			Method validation (C)		
V_{C1}	148 (73+76)	$X = 154$	V_{C1}	123 (50+73)	$X = 119$	V_{C1}	132 (67+65)	$X = 128$	V_{C1}	79 (37+42)	$X = 87$
V_{C2}	160 (85+75)		V_{C2}	115 (56+59)		V_{C2}	124 (62+64)		V_{C2}	95 (43+52)	
$30 \leq X \text{ of } Nv_o \leq 160$ The test is VALID			$x \text{ of } A \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID			$x \text{ of } B \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID			$x \text{ of } C \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID		

Test suspension	Test Suspension (N):	N	V_{C1}	V_{C2}	$X_{wm} = 202 \times 10^5$; $\lg N = 7,30$ $N_0 = N/10$; $\lg N = 6,30$ $6,17 \leq \lg N \leq 6,70 \Rightarrow$ The test is VALID <i>*used for calculation</i>
		10^{-5}	205*	200*	
		10^{-6}	45	40	

Results <i>Na</i>	Conc. of the product %	V_{C1}	V_{C2}	$Lg Na = X \times 10$	$Lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 6,30$)	Contact Time (min)
	20%	>660	>660	>6600	>3,82	<2,48	10 min
	40%	200	210	2050	3,31	2,99	10 min
	80%	20	16	180	2,25	4,05	10 min

Legenda / Explanation: V_C = count per ml (one plate duplicate) X = average of V_{C1} and V_{C2} (1 + 2 duplicate) X_{wm} = weighted mean of X R = reduction ($\lg R = \lg N_0 - \lg Na$)

RISULTATI TEST (PROVA EFFICACIA FUNGICIDA IN SOSPENSIONE)
Test results (fungicidal suspension test)

Nome Prodotto / Product-name: **KILL PLUS**

Produttore / Manufacturer:

NETTUNO SRL Via Industria, 16/18 - 24060 CASELLI CALEPIO (BG) - Italy

Concentrazione d'uso: pronto all'uso.

Condizioni di stoccaggio: Conservare in luogo fresco e asciutto / *Storage conditions: Store in a cool dry place.*

Concentrazione test: 80%, 40%, 20% in acqua. *Test Concentration: 80%, 40%, 20% on water.*

Nessun precipitato durante la procedura di analisi / *No precipitate during the test procedure (test mixture is homoneneous).*

Metodo Neutralizzazione – Diluizione / Metodo in inclusione in piastra/ *Diluition neutralization method /*

Inclusion on MEA on plate Petri method; Numero di piastre / *Number of plates* 1 / ml (2 / diluizione / *diluition*)

Neutralizzante / *Neutralizer:* . 30 g/l polysorbate 80; lecithin 3 g/ ; saponin 30 g/l; L-histidine 1 g/l in diluent.

Test temperature: 20°C.

Test organism: *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Incubation temperature: 30°C

Data fine analisi: 20/10/2015.

End date test: 2015-10-20.

<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404			CLEAN CONDITION Interfering substances: BSA 0,3 g/l bovine serum albumin								
Validation suspension (Nv_o)			Experimental Conditions control (A)			Neutralizer control (B)			Method validation (C)		
V_{C1}	115 (62 + 53)	$X = 113$	V_{C1}	78 (45 + 33)	$X = 89$	V_{C1}	90 (47 + 43)	$X = 97$	V_{C1}	76 (36 + 40)	$X = 78$
V_{C2}	111 (64 + 47)		V_{C2}	100 (54 + 46)		V_{C2}	104 (56 + 48)		V_{C2}	80 (41 + 39)	
$30 \leq X \text{ of } Nv_o \leq 160$ The test is VALID			$x \text{ of } A \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID			$x \text{ of } B \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID			$x \text{ of } C \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID		

Test suspension	Test Suspension (N):	N	V_{C1}	V_{C2}	$X \text{ wm} = 155 \times 10^5$; $\lg N = 7,19$ $N_0 = N/10$; $\lg N = 6,19$ $6,17 \leq \lg N \leq 6,70 \Rightarrow$ The test is VALID <i>*used for calculation</i>
		10^{-5}	150*	160*	
		10^{-6}	40	35	

Results <i>Na</i>	Conc. of the product %	V_{C1}	V_{C2}	$\text{Lg } Na = X \times 10$	$\text{Lg } Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 6,19$)	Contact Time (min)
	20%	>660	>660	>6600	>3,82	<2,37	10 min
	40%	195	150	1725	3,23	2,96	10 min
	80%	14	13	135	2,13	4,06	10 min

Legenda / Explanation:

V_C = count per ml (one plate duplicate)

X = average of V_{C1} and V_{C2} (1 + 2 duplicate)

$X \text{ wm}$ = weighted mean of X

R = reduction ($\lg R = \lg N_0 - \lg Na$)

<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404			DIRTY CONDITION: Interfering substances: BSA 3 g/l bovine serum albumin								
Validation suspension (Nv_0)			Experimental Conditions control (A)			Neutralizer control (B)			Method validation (C)		
V_{C1}	115 (62+53)	$X = 113$	V_{C1}	75 (35+40)	$X = 87$	V_{C1}	90 (47+43)	$X = 97$	V_{C1}	72 (39+33)	$X = 75$
V_{C2}	111 (64+47)		V_{C2}	99 (53+46)		V_{C2}	104 (56+48)		V_{C2}	78 (37+39)	
$30 \leq X \text{ of } Nv_0 \leq 160$ The test is VALID			$x \text{ of } A \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_0$ The test is VALID			$x \text{ of } B \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_0$ The test is VALID			$x \text{ of } C \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_0$ The test is VALID		

Test suspension	Test Suspension (N):	N	V_{C1}	V_{C2}	$X \text{ wm} = 155 \times 10^5$; $\lg N = 7,19$ $N_0 = N/10$; $\lg N = 6,19$ $6,17 \leq \lg N \leq 6,70 \Rightarrow$ The test is VALID <i>*used for calculation</i>
		10^{-5}	150*	160*	
		10^{-6}	40	35	

Results <i>Na</i>	Conc. of the product %	V_{C1}	V_{C2}	$\text{Lg } Na = X \times 10$	$\text{Lg } Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 6,19$)	Contact Time (min)
	20%	>660	>660	>6600	>3,82	<2,37	10 min
	40%	220	250	2350	3,37	2,82	10 min
	80%	16	15	155	2,19	4,00	10 min

Legenda / Explanation:

V_C = count per ml (one plate duplicate)

X = average of V_{C1} and V_{C2} (1 + 2 duplicate)

$X \text{ wm}$ = weighted mean of X

R = reduction ($\lg R = \lg N_0 - \lg Na$)



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA / UNIVERSITY OF FERRARA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE E DIAGNOSTICA / DPT. EXP. & DIAGNOSTIC MEDICINE
SEZIONE DI MICROBIOLOGIA / SECTION OF MICROBIOLOGY
via LUIGI BORSARI, 46 – 44100 FERRARA - ITALY

REPORT European standard UNI EN 1500:2000

Valutazione del trattamento igienico delle mani per frizione del prodotto:

/

Evaluation of the hygienic handrub of a product:

PRODOTTO:

<<KILL PLUS NETTUNO>>

LOTTO 131109

Applicazione dei metodi e i criteri di accettabilità della
NORMA EUROPEA UNI EN 1500 / 2000 : **Disinfettanti chimici ed antisettici**
Trattamento igienico delle mani per frizione.
Metodo di prova e prescrizioni (fase 2/stadio 2)

Chemical disinfectants and antiseptics EUROPEAN STANDARD
Hygienic handrub. Test method and requirements
UNI EN 1500/2000 (phase 2/step 2)

COMMITTENTE / CUSTOMER:

NETTUNO SRL

Viale Industria, 16/18
24060 Caselli Calepio (BG)

Ferrara, 18 december 2009
Ferrara: december 18th 2009



Prodotto / Product: << KILL PLUS NETTUNO >>

LOTTO 131109

COMMITTENTE / CUSTOMER:

NETTUNO SRL

Viale Industria, 16/18

24060 Caselli Calepio (BG)

INDICE / CONTENTS:

INTRODUZIONE / FOREWORD	pag./ page	3
1 - DEFINIZIONI / DEFINITIONS	pag./ page	3
2 - CARATTERIZZAZIONE DEL PRODOTTO / PRODUCT IDENTITY	pag./ page	4
Applicazione dei metodi e i criteri di accettabilità della norma europea UNI EN 1500 / 2000		
Disinfettanti chimici ed antisettici: Trattamento igienico delle mani per frizione.		
Metodo di prova e prescrizioni (fase 2/stadio 2) /		
<i>Chemical disinfectants and antiseptics Hygienic handrub. Test method and requirements</i>		
EUROPEAN STANDARD UNI EN 1500/2000 (phase 2/step 2)		
3-METODO DI PROVA / TEST METHOD	pag./ page	5
3.1 – Principio	pag./ page	5
3.2 – Programma della sperimentazione	pag./ page	5
3.3 – Soggetti	pag./ page	5
3.4 – MATERIALI E REAGENT / MATERIAL AND REAGENT	pag./ page	5
3.4.1 MICRORGANISMI TEST / TEST MICROORGANISM	pag./ page	5
3.4.2 TERRENI DI COLTURA E REAGENT / MEDIA AND REAGENTS	pag./ page	5
3.4.3 APPARECCHIATURE	pag./ page	6
4 – PROCEDIMENTO	pag./ page	7
4.1 – Preparazione della sospensione di contaminazione	pag./ page	7
4.2 – Applicazione della sospensione di contaminazione	pag./ page	7
4.3 – Valori iniziali	pag./ page	7
4.4 – Valori finali	pag./ page	8
5 – CALCOLO / CALCULATION	pag./ page	9
6 – CONVALIDA DELLA PROVA / VERIFICATION OF THE METHODOLOGY	pag./ page	9
7 – RISULTATI / RESULTS	pag./ page	10
8 – CONCLUSIONI / CONCLUSIONS	pag./ page	10
9 – APPENDICE / ANNEX	pag./ page	11
9.1- APPENDICE 1 / ANNEX 1 :	pag./ page	11



INTRODUZIONE / FOREWORD

Valutazione del trattamento igienico delle mani per frizione di un prodotto / Evaluation of the hygienic handrub of a chemical disinfectants and antiseptics .

NORMA EUROPEA UNI EN 1500 / 2000 (fase 2/stadio 2): Disinfettanti chimici ed antisettici. Trattamento igienico delle mani per frizione. Metodo di prova e prescrizioni.

Chemical disinfectants and antiseptics EUROPEAN STANDARD UNI EN 1500 / 2000 (phase 2/step 2):Hygienic handrub. Test method and requirements

SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente norma europea specifica un metodo di prova che simula condizioni pratiche per stabilire se un certo prodotto, impiegato per il trattamento igienico delle mani per frizione riduce il rilascio della flora batterica transitoria, in conformità con le prescrizioni, quando viene usato per la frizione delle mani di volontari, artificialmente contaminate.

La presente norma europea si applica a prodotti per il trattamento igienico per frizione delle mani, da impiegare in zone e in situazioni nelle quali è indicata la disinfezione delle mani o che è reso necessario nei luoghi di lavoro e nelle abitazioni. Possono anche riguardare settori come le lavanderie e le cucine.

1.DEFINIZIONI / DEFINITIONS

In questo documento sono presenti i seguenti termini e relative definizioni / *For the method of this document, the following definitions apply:*

PRODOTTO (ANTISETTICO E/O PER DISINFEZIONE CHIMICA): Agente o formulazione chimica impiegata come disinfettante chimico e/o antisettico [EN 1040].

TRATTAMENTO IGIENICO DELLE MANI PER FRIZIONE: Procedimento di trattamento di postcontaminazione, che prevede il lavaggio delle mani per frizione senza l'aggiunta di acqua utilizzando un prodotto battericida diretto contro i microrganismi transitori, per impedire la loro trasmissione, indipendentemente dalla flora batterica residente sulla pelle.

VALORE INIZIALE: Numero di unità formanti colonia (ufc), prelevate dalle mani, prima del trattamento.

VALORE FINALE: Numero di unità formanti colonia (ufc), prelevate dalle mani, dopo il trattamento.

FATTORE DI RIDUZIONE (RF): Rapporto tra i valori iniziali ed i valori finali, generalmente espresso mediante logaritmi decimali: $\log_{10} RF = \log_{10} \text{del valore iniziale} - \log_{10} \text{del valore finale}$.



2-CARATTERIZZAZIONE DEL PRODOTTO / PRODUCT IDENTITY:

2.1 - Identificazione del campione ad attività antibatterica:

Nome del prodotto / Product: << KILL PLUS NETTUNO >>

LOTTO 131109

Descrizione del prodotto: è una soluzione igienizzante mani, che deve essere distribuito in modo uniforme sulla cute delle mani senza bisogno dell'utilizzo dell'acqua.

Modalità d'uso: spruzzare o versare direttamente sulle mani la quantità desiderata di prodotto, frizionare fino a quando le mani non sono asciutte.

Concentrazione d'uso: 100% pronto all'uso / Product concentrate: 100% ready to use.

Produttore / Manufacturer:

NETTUNO SRL

Viale Industria, 16/18

24060 Caselli Calepio (BG)

2.2 - Periodo test / Period of testing:

Periodo di analisi del prodotto: 03/12/2009 al 18/12/2009.

Dates of test: 2009-12-03 / 2009-12-18.

Riferimento Normativa:

EUROPEA UNI EN 1500 / 2000 : Disinfettanti chimici ed antisettici Trattamento igienico delle mani per frizione. Metodo di prova e prescrizioni (Fase 2 / Stadio 2)

2.3 - Condizioni sperimentali / Experimental conditions

Concentrazione del prodotto / product concentration:

Prodotto pronto all'uso / ready to use.

Concentrazione del prodotto in esame: 100%.

Product undiluted: concentration of the product tested: 100%.

Condizioni obbligatorie / Obligatory test conditions:

Test-microorganisms:

Escherichia coli ATCC 10536;

Staphylococcus aureus ATCC 6538;

Enterococcus hirae ATCC 10541;

Temperatura test / Test temperature: 20 °C;

Tempo di contatto / Contact time:

- **1 minuto.**



3 - METODO DI PROVA

3.1 - Principio

Viene valutato il numero di microrganismi di prova presenti sulla punta delle dita delle mani contaminate artificialmente, prima e dopo il trattamento igienico per frizione delle mani.

Il rapporto dei due valori risultanti è denominato fattore di riduzione. Esso rappresenta una misura dell'attività antimicrobica del prodotto sottoposto a prova per il trattamento igienico per frizione delle mani.

Viene effettuato il procedimento in parallelo utilizzando una sostanza di riferimento (R), propan-2-olo di riferimento, di trattamento igienico per frizione delle mani, che viene effettuato con gli stessi soggetti, nello stesso giorno ed in condizioni ambientali paragonabili.

3.2 - Programma della sperimentazione

Per sottoporre a prova un dato prodotto per volta, viene utilizzato un programma di sperimentazioni incrociate. I soggetti sono separati a caso in due gruppi, approssimativamente dello stesso numero. La prova è eseguita una prima volta con il gruppo 1, che utilizza il trattamento igienico di riferimento per frizione delle mani, e con il gruppo 2 che utilizza il trattamento igienico per frizione con il prodotto sottoposto a prova.

La prova è quindi ripetuta lo stesso giorno con il gruppo 1, utilizzando il trattamento igienico per frizione con il prodotto di prova, e con il gruppo 2, utilizzando il trattamento di riferimento.

3.3 - Soggetti

La prova deve essere effettuata su di un numero di persone sane adulte, che presentino la pelle delle mani sana, senza tagli o abrasioni e con le unghie corte e pulite.

3.4 - Materiali

3.4.1 - Microorganismi di prova ceppi ATCC:

-*Escherichia coli*

-*Staphylococcus aureus*

-*Enterococcus hirae*

3.4.2 - Mezzi di coltura e reagenti

I reagenti devono essere di qualità analitica e/o idonei per scopi microbiologici.

Acqua

L'acqua deve essere esente da sostanze tossiche o inibitrici rispetto ai batteri. Deve essere acqua distillata recentemente, da apparecchi di vetro e non demineralizzata.

Sterilizzare nell'autoclave.



Tryptone - soia - agar (TSA)

Terreno di coltura per conservare i ceppi batterici ed effettuare le conte vitali.

TSA:

Tryptone, digestione pancreatica di caseina 15,0 g

Peptone di soia, digestione papainica di farina di soia 5,0 g

NaCl 5,0 g

Agar 15,0 g

Acqua demineralizzata fino a 1 000,0 ml

Sterilizzare nell'autoclave. Dopo sterilizzazione il pH del mezzo di coltura deve essere di 7,2 \pm 0,2, se misurato a 20 °C.

Brodo di coltura di triptone di soia (TSB)

Per la preparazione della sospensione di contaminazione:

Tryptone, digestione pancreatica di caseina 15,0 g

Peptone di soia, digestione papainica di farina di soia 5,0 g

NaCl 5,0 g

Acqua demineralizzata fino a 1 000,0 ml

Sterilizzare nell'autoclave. Dopo sterilizzazione, il pH del mezzo di coltura deve essere di 7,2 \pm 0,2, se misurato a 20 °C.

Neutralizzante

È stato scelto il seguente neutralizzante:

Lecitina	3 g	MERCK
Polisorbato 80	30 g	MERCK
Sodio tiosolfato	5 g	MERCK
L-istidina	1 g	MERCK
Saponina	30 g	SIGMA
Acqua distillata q.b. a	100 ml	

Propan-2-olo al 60% (v/v).

3.4.3 - APPARECCHIATURE

- | | |
|---|---------|
| - Stufa per la sterilizzazione a secco | KW |
| - Autoclave a vapore | COLUSSI |
| - Incubatore a temperatura 36 \pm 1°C | MEMMERT |
| - pHmetro | BECKMAN |
| - Agitatore Vortex | VELP |
| - Cronometro | ARBORE |
| - Micropipette | GILSON |
| - Pipette graduate di capacità nominale 10 ml, 1 ml e 0, ml monouso | |
| - Capsule Petri diametro 90 mm. | |
| - Contenitore di capacità sufficiente per contenere una mano immersa fino a metà dei metacarpi. | |



4 - PROCEDIMENTO

4.1 - Preparazione della sospensione di contaminazione

Coltivare i ceppi microbici in provette contenenti ciascuna 5 ml di TSB per un periodo di tempo compreso tra 18 h e 24 h a 36 ± 1 °C. Inoculare queste colture in due flaconi con 1 l di TSB ciascuno, e incubare per un periodo di tempo compreso tra 18 h e 24 h a 36 ± 1 °C. Mescolare la sospensione batterica risultante.

Questa sospensione di contaminazione deve contenere tra 2×10^8 ufc/ml e 2×10^9 ufc/ml.

4.2 - Applicazione della sospensione di contaminazione

Preparare le mani lavandole per 1 min con sapone molle, per eliminare la flora batterica naturale transitoria. Asciugare le mani accuratamente su tovaglioli di carta.

Versare nel contenitore la sospensione di contaminazione ed immergere le mani fino alla metà dei metacarpi per 5 s, con le dita ben distanziate tra loro. Il liquido in eccesso si lascia scolare accuratamente nel contenitore.

Fare asciugare le mani all'aria per 3 min, tenendole in posizione orizzontale, con le dita ben distanziate tra loro, e ruotandole avanti ed indietro per evitare la formazione di goccioline.

Un lotto di sospensione di contaminazione non deve essere più utilizzato, dopo che siano trascorse più di 3 h dal momento in cui sono state contaminate le mani del primo volontario.

Inoltre, in una prova, ci si deve assicurare che le mani di tutti i volontari siano state trattate con lo stesso lotto di sospensione di contaminazione.

4.3 - Valori iniziali

Immediatamente dopo l'essiccazione, strofinare le punte delle dita (incluso quelle dei pollici) per 1 min sulla base di una capsula di Petri contenente 10 ml di TSB senza neutralizzante, al fine di valutare il rilascio di microrganismi di prova, prima del trattamento delle mani (valori iniziali). Usare una capsula di Petri separata per ciascuna mano.

Preparare diluizioni di 10^{-3} e 10^{-4} in TSB di questi fluidi di campionamento. Per ciascuna diluizione distribuire 0,1 ml sulla superficie di una piastra di TSA, utilizzando spatole di vetro. L'intervallo tra campionamento e semina non deve essere maggiore di 30 min.

4.4 - Procedimento di trattamento igienico delle mani per frizione

Immediatamente dopo il campionamento per la misura dei valori iniziali e senza ricontaminare le mani, i gruppi devono procedere al trattamento igienico delle mani per frizione.



Procedimento di riferimento (R) per il trattamento igienico delle mani per frizione

Versare 3 ml di propan-2-olo al 60% (v / v) sulle mani disposte a coppa, asciutte e frizionarne vigorosamente la pelle fino ai polsi per 30 s, in conformità al procedimento normalizzato di trattamento igienico delle mani per frizione, per assicurarne la copertura totale.

Ciascuna fase delle operazioni descritte è ripetuta cinque volte, con movimenti avanti ed indietro, cioè palmo contro palmo, palmo della mano destra sul dorso della mano sinistra, palmo della mano sinistra sul dorso della mano destra, palmo su palmo con le dita intrecciate tra loro, retro delle dita sui palmi opposti con le dita intrecciate, strofinio con rotazione del pollice destro afferrato nel palmo sinistro, e del pollice sinistro afferrato nel palmo destro, strofinio con rotazione con le dita della mano destra congiunte nel palmo della mano sinistra e con le dita della mano sinistra congiunte nel palmo della destra.

Ripetere con ulteriori 3 ml di propan-2-olo, per dare un tempo totale di frizione di 60 s.

Procedimento di trattamento igienico delle mani per frizione con il prodotto di prova (P)

<<KILL PLUS NETTUNO LOTTO 131109>>

Una dose pari a 3 ml di soluzione è versata sulle mani disposte a coppa, asciutte e frizionarne vigorosamente la pelle fino ai polsi per 30 s, in conformità al procedimento normalizzato di trattamento igienico delle mani per frizione, per assicurarne la copertura totale.

Il prodotto test viene distribuito con movimenti avanti ed indietro, cioè palmo contro palmo, palmo della mano destra sul dorso della mano sinistra, palmo della mano sinistra sul dorso della mano destra, palmo su palmo con le dita intrecciate tra loro, retro delle dita sui palmi opposti con le dita intrecciate, strofinio con rotazione del pollice destro afferrato nel palmo sinistro, e del pollice sinistro afferrato nel palmo destro, strofinio con rotazione con le dita della mano destra congiunte nel palmo della mano sinistra e con le dita della mano sinistra congiunte nel palmo della destra.

Il tempo totale di lavaggio è limitato a 30 s.

4.5 - Valori finali

Immediatamente dopo, strofinare le punte delle dita e le punte dei pollici per 1 min sul fondo di una capsula di Petri, contenente 10 ml di TSB, contenente neutralizzante. Usare una capsula di Petri separata per ciascuna mano.

Seminare campioni da 1,0 ml e da 0,1 ml del fluido di campionamento non diluito e 0,1 ml di una diluizione 10^{-1} in TSB, contenente neutralizzante, sulla superficie di piastre di TSA, utilizzando spatole di vetro. Se necessario, ripetere con 0,1 ml di una diluizione 10^{-2} .

L'intervallo tra il prelievo e la semina non deve essere maggiore di 30 min.

4.6 - Incubazione

Incubare tutte le piastre in aerobiosi alla temperatura di 36 ± 1 °C, per un tempo compreso tra 18 h e 24 h. Conteggiare le unità formanti colonia ed incubare per ulteriori 24 h, per rivelare tutte le colonie a crescita lenta.



5 – CALCOLO

Registrare il numero di unità formanti colonia (ufc) per piastra, per ciascuno stadio di diluizione.

Calcolare il fattore di diluizione moltiplicando la diluizione del campione per il volume del campione (in millilitri). Calcolare il numero di ufc per millilitro di sospensione di campionamento, moltiplicando la conta di piastra (ufc) per il fattore di diluizione.

Quando possibile, le conte dovrebbero essere ottenute da piastre che presentino un numero di colonie compreso tra 15 e 300 colonie. Con trattamenti molto efficienti di frizione delle mani, alcune piastre possono presentare meno di 15 colonie oppure una totale assenza di crescita, anche se inoculate con 1 ml di fluido di campionamento non diluito. Questi valori possono venire quindi accettati.

Tutte le conte vitali per ml di fluido di campionamento sono trasformate in logaritmi decimali.

Sia per il procedimento di prova che per il procedimento di riferimento, le conte logaritmiche dalle mani destra e sinistra di ciascun volontario devono essere mediate separatamente per i valori iniziali e finali.

Dalla differenza tra questo valore iniziale logaritmico individuale combinato e il valore finale logaritmico viene stabilito per ciascun soggetto un fattore di riduzione logaritmico.

Quindi, sia per il procedimento di riferimento che per il procedimento di prova sono calcolate le due medie aritmetiche di tutti i fattori individuali di riduzione logaritmica.

6 - CONVALIDA DELLA PROVA

Se sono conformi ai requisiti di seguito elencati, i risultati di una prova devono essere accettati.

I requisiti per l'accettazione dei risultati delle prove sono i seguenti:

- la media complessiva dei valori iniziali logaritmici per il procedimento di prova e di riferimento deve essere almeno 5,00;
- per ciascun procedimento (R) e (P) non più di tre fattori individuali di riduzione logaritmica devono risultare minori di 3,00.

6.1 - Valutazione di P

Se è stato riscontrato che la qualità dei dati è accettabile, essi devono essere impiegati per la valutazione dell'efficacia antimicrobica del prodotto sottoposto a prova, applicando i seguenti criteri di accettazione:

- per il prodotto test il fattore medio di riduzione logaritmica ottenuto, non deve essere significativamente minore di quello ottenuto per il propan-2-olo di riferimento;
- se il fattore medio di riduzione logaritmico di un prodotto di prova è minore di quello ottenuto con il propan-2-olo di riferimento, deve essere sottoposta a prova la differenza per valutare la significatività statistica;
- se il fattore medio di riduzione logaritmica è minore in maniera significativa di quello ottenuto con il propan-2-olo di riferimento, il prodotto di prova non è conforme alla presente norma.



7 – RISULTATI / RESULTS

Risultati sperimentali. Procedimento di trattamento delle mani per frizione con il prodotto test:
 <<KILL PLUS NETTUNO>> - LOTTO 131109:

MICROORGANISMI TEST	Valore Iniziale* \log_{10}	Valore finale* \log_{10} Tempo di contatto: 1 min.	% Rid.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	6,22	3,43	99,8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	6,30	3,20	99,9
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	6,35	3,35	99,9

*Valori medi dei valori in \log_{10} dei risultati mano destra e mano sinistra

FR=fattore di riduzione

% Rid= percentuale di riduzione microbica dopo il tempo di contatto del prodotto in esame.

\log_{10} =valori espressi in logaritmo.

8 – CONCLUSIONI / CONCLUSIONS:

In base alla metodica applicata e ai criteri di accettabilità della Normativa europea UNI EN 1500/2000 (Fase 2 / Stadio 2), il prodotto in esame “ **KILL PLUS NETTUNO** ” - **LOTTO 131109**, alla concentrazione del 100%, pronto all’uso, presenta **ATTIVITÀ ANTIMICROBICA** dopo 1 minuto di contatto pari a una riduzione del 99,9% nei confronti dei ceppi *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Enterococcus hirae* ATCC 10541 e pari a una riduzione del 99,8% nei confronti di *Escherichia coli* ATCC 10536



Prof. Balboni

Prof. Balboni
(Signature)

UNIVERSITY OF FERRARA
DPT. EXP. & DIAGNOSTIC MEDICINE
SECTION OF MICROBIOLOGY

Ferrara, 18/12/2009.



9 – ANNEX

9.1 – ANNEX N.1:

TABELLE RISULTATI SPERIMENTALI PER IL TRATTAMENTO DELLE MANI PER FRIZIONE

Prodotto di Trattamento delle mani per frizione <<KILL PLUS NETTUNO>> - LOTTO 131109

Applicazione: frizionare le mani con 3 ml per 30 s, ripetere una sola volta.

Tempo di contrato: 1 minuto dopo l'applicazione.

Microorganismo di prova: *Escherichia coli* Sospensione iniziale: $2,2 \times 10^8$ cfu/ml

N.	mano	Valori iniziale T_0^* 10^{-4}	Valori finali $T_{1 \text{ min}}$ 10^{-3}	FR $T_{1 \text{ min}}$	RID.valore medio %
1	d	300	30	3,25	99,93
	s	290	10		
2	d	140	26	3,50	99,70
	s	110	40		
3	d	150	34	3,20	99,70
	s	140	52		
4	d	120	10	3,40	99,71
	s	120	60		
5	d	110	21	3,40	99,85
	s	300	30		

* Numero di cfu per piastra ottenuto alla diluizione di 10^4

Microorganismo di prova: *Staphylococcus aureus* Sospensione iniziale: $2,0 \times 10^8$ cfu/ml

N.	mano	Valori iniziale T_0^* 10^{-4}	Valori finali $T_{1 \text{ min}}$ 10^{-3}	FR $T_{1 \text{ min}}$	RID.valore medio %
1	d	250	12	3,00	99,96
	s	300	8		
2	d	260	16	3,25	99,90
	s	160	22		
3	d	150	20	3,40	99,80
	s	110	30		
4	d	210	9	3,00	99,94
	s	130	11		
5	d	240	40	3,35	99,89
	s	250	13		

* Numero di cfu per piastra ottenuto alla diluizione di 10^4

Microorganismo di prova: *Enterococcus hirae* Sospensione iniziale: $2,0 \times 10^8$ cfu/ml

N.	mano	Valori iniziale T_0^* 10^{-5}	Valori finali $T_{1 \text{ min}}$ 10^{-3}	FR $T_{1 \text{ min}}$	RID.valore medio %
1	d	200	20	3,30	99,91
	s	200	17		
2	d	150	24	3,35	99,87
	s	180	19		
3	d	170	20	3,35	99,86
	s	170	19		
4	d	330	27	3,30	99,93
	s	320	19		
5	d	250	20	3,45	99,88
	s	240	30		

* Numero di cfu per piastra ottenuto alla diluizione di 10^4



Prodotto di riferimento: Propan-2-olo 60% (v/v)

Applicazione: frizionare le mani con 3 ml per 30 s, ripetere una sola volta

Tempo di contratto: 1 minuto dopo l'applicazione.

Microorganismo di prova: *Escherichia coli* ATCC 10536; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Enterococcus hirae* ATCC 10541.

Sospensione iniziale: $4,0 \times 10^8$ cfu/ml

N.	mano	Valori iniziale T_0^* 10^{-4}	Valori finali $T_{1\text{min}}$ 10^{-2}	FR $T_{1\text{min}}$	RID.valore medio %
1	d s	150 180	85 90	3,30	99,9
2	d s	100 160	90 90	3,15	99,9
3	d s	150 170	90 90	3,30	99,9
4	d s	120 190	80 90	3,30	99,9
5	d s	120 150	90 90	3,25	99,9

* Numero di cfu per piastra ottenuto alla diluizione di 10^4

Ferrara, 18/12/2009.

