

Spett
ICM SRL
C.DA TORRE SNC - 89040
PORTIGLIOLA (RC) ITALY

**DISINFETTANTI CHIMICI ED ANTISETTICI -
TEST QUANTITATIVO IN SOSPENSIONE PER
LA VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ
SPORICIDA DEI DISINFETTANTI CHIMICI IN
CAMPO MEDICO - UNI EN 17126:2019
(FASE 2, STEP 1)**

**CHEMICAL DISINFECTANTS AND
ANTISEPTICS - QUANTITATIVE SUSPENSION
TEST FOR THE EVALUATION OF
SPORICIDAL ACTIVITY OF CHEMICAL
DISINFECTANTS IN THE MEDICAL AREA -
UNI EN 17126:2019
(PHASE 2, STEP 1)**

0	15/01/2023	1° Emissione	Christian Cirillo	Giuseppe Chindemi	Giuseppe Chindemi
Rev.	Data	Causale	Redazione	Verifica	Approvazione

Pag. 1 a 14

EuroLab S.r.l.

- inserito negli elenchi del Ministero della Salute con Prot. n. 600.5/59.735/3102).
- Iscritto al n.6 del Registro Regionale dei Laboratori di Analisi per l'autocontrollo nelle Aziende Alimentari

- Approvato dalla Regione Calabria per l'istituzione di percorsi formativi degli alimentaristi ed operatori del settore alimentare (OSA)
- Laboratorio accreditato ACCREDIA n° 0843 solo per le prove soggette ad accreditamento

Sede Legale: Viale Mare Ionio, 4 - 89040
Marina di Caulonia (RC) - P.I. 02052720808
e-mail: eurolab_srl@libero.it
www.eurolab-srl.it
Tel./Fax 0964/82185
Mob. 3929622100

INDICE

1 INFORMAZIONI GENERALI / GENERAL INFORMATION	3
1.1 CAMPIONE ANALIZZATO / TESTED SAMPLE	3
1.2 TEST / ASSAY	3
1.3 DATE DELLO STUDIO / STUDY DATES	3
2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE / STUDY DESIGN.....	4
2.1 SCOPO DEL TEST / PURPOSE OF THE TEST	4
2.2 CEPPO UTILIZZATO E METODICA / USED STRAIN AND METHOD	6
2.3 CONDIZIONI DEL TEST / TESTING CONDITIONS	7
2.4 VALUTAZIONE DEI RISULTATI / EVALUATION OF RESULTS	8
3 RISULTATI E CONCLUSIONI / RESULTS AND CONCLUSIONS	10
3.1 RISULTATI / RESULTS	10
3.2 CONCLUSIONI / CONCLUSIONS	13
4 BIBLIOGRAFIA.....	14

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

Riferimenti a limiti e/o norme non sono oggetto di accreditamento ACCREDIA

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

References to limits and/or standards are not subject to ACCREDIA accreditation

1 INFORMAZIONI GENERALI / GENERAL INFORMATION

1.1 CAMPIONE ANALIZZATO / TESTED SAMPLE

Campione/Sample	Codice interno/Internal Code	Descrizione/Description
EC STER - Concentrazione 0,45% = 4,5 g/l Lotto/Batch: S5/22	4472/22-04	polvere/powder

Produttore/Manufacturer: ICM Srl

Data di arrivo/Date of delivery: 15/11/2022

Data di scadenza/expiring date: N/A

Diluyente indicato /Recommended diluent: acqua rete idrica comunale/ municipal water mains

Condizioni di conservazione/Storage conditions: Il campione è stato conservato a temperatura ambiente/ the sample has been stored at room temperature

Concentrazione testata/Tested concentration: 100%

1.2 TEST / ASSAY

Test per la valutazione dell'attività sporicida di disinfettanti chimici e prodotti antisettici in accordo alla norma UNI EN 17126:2019.

Test for the evaluation of the sporicidal activity of chemical disinfectants and antiseptic products according to the UNI EN 17126:2019 standard.

1.3 DATE DELLO STUDIO / STUDY DATES

Inizio / Start: 13/12/2022

Fine / End: 13/01/2023

2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE / STUDY DESIGN

2.1 SCOPO DEL TEST / PURPOSE OF THE TEST

Lo scopo del test è stabilire se un disinfettante chimico o prodotto antisettico miscibile in acqua, destinato all'utilizzo in campo medico per l'attività sporicida. La norma UNI EN 17126:2019 stabilisce il metodo per verificare tale attività e i requisiti minimi. L'attività sporicida viene valutata con una prova in sospensione verso *Clostridium difficile* R027 NCTC 13366, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 9634. L'azione sporicida è dimostrata quando il prodotto mostra una riduzione di almeno 4 logaritmi dei microrganismi testati dopo un tempo di contatto definito, ad una temperatura di 20°C ed in presenza di sostanze interferenti che simulano le condizioni d'uso. L'attività sporicida viene testata a tre concentrazioni diverse.

The purpose of the test is to establish whether a chemical disinfectant or antiseptic product miscible in water, intended for use in the medical field for sporicidal activity. The UNI EN 17126:2019 standard establishes the method for verifying this activity and the minimum requirements. The sporicidal activity is evaluated with a suspension test against *Clostridium difficile* R027 NCTC 13366, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 9634. The sporicidal action is demonstrated when the product shows a reduction of at least 4 logarithms of the microorganisms tested after a time defined contact, at a temperature of 20°C and in the presence of interfering substances which simulate the conditions of use. The sporicidal activity is tested at three different concentrations.

Tabella / Table 2.1.1 – Condizioni del test / Test conditions

Condizioni del test/ Test conditions	Attività battericida/Bactericidal activity
Ceppo testato / Tested strain	Clostridium difficile Bacillus subtilis Bacillus cereus
Temperatura di test / Test temperature	Temperature ambiente/ room temperature 18-25°C
Tempo di contatto / Contact time	1 minuto / minutes
Riduzione logaritmica / Log reduction	≥ 4 Log
Diluizione del campione / Dilution of the sample	100%
Temperatura di incubazione del test/ Test incubation temperature	Clostridium difficile in condizioni anaerobiche a 36 ±1°C / Clostridium difficile under anaerobic conditions at 36 ±1°C Bacillus subtilis e Bacillus cereus 36 ± 1°C / Bacillus subtilis and Bacillus cereus 36 ± 1°C /

2.2 CEPPO UTILIZZATO E METODICA / USED STRAIN AND METHOD

Il ceppo utilizzato è stato subcoltivato a partire dalla coltura madre come descritto nella norma, ma diluito in acqua sterile come indicato dal cliente.

The working culture has been prepared from the stock culture as described in the standard but diluted in sterile water as indicated by the customer.

Tabella / Table 2.2.1 – Ceppo utilizzato e inoculo / Used strain and inoculum

CEPPO/STRAIN	Condizioni di crescita/Growth conditions	Inoculo richiesto/required inoculum (CFU/ml)	Inoculo testato/Tested inoculum (CFU/ml)
Clostridium difficile R027 NCTC 13366	In anaerobiosi/ under anaerobic Tryptic soy agar (1-2 days – 36°C)	1,5 – 5,0 x 10 ⁷	1.9 x 10 ⁷
Bacillus subtilis ATCC 6633	Tryptic soy agar (1-2 days – 36°C)		2.1 x 10 ⁷
Bacillus cereus ATCC 9634			2.6 x 10 ⁷

La validazione del metodo prevede la verifica dell'idoneità del test al recupero dei microrganismi (test A) e la dimostrazione che la soluzione neutralizzante non inibisce la crescita dei microrganismi (test B) e blocca l'azione del prodotto (test C).

The method validation includes the verification of the microorganism recovery efficiency in the testing conditions (test A) and the demonstration that the neutralizing solution does not interfere with the growth (test B) and is able to inactivate the product (test C).

Tabella / Table 2.2.2 – Soluzione Neutralizzante / Neutralizer composition

Tween 80

Lecitina di soia

L-histidin

Sodium thiosulphate

Sodium Chloride

Potassium dihydrogen phosphate

Sodium phosphate dibasic

2.3 CONDIZIONI DEL TEST / TESTING CONDITIONS

Il campione viene preparato secondo indicazioni del cliente, seguendo la procedura che ci è stata fornita:

- Versare l'intero flacone di polvere in un contenitore pulito e solubilizzare in 562,5 ml di acqua sterile per iniezione per ottenere una soluzione al 125%;
- Mescolare bene la soluzione e attendere fino alla completa dissoluzione della polvere;
- Attendere 30 minuti prima dell'esecuzione della prova.

The sample is prepared according to the customer instructions, following the procedure that is provided to the laboratory:

- Pour the entire vial of powder and solubilize it in 562.5 ml of sterile water for injection to obtain a 125% solution;
- Mix the solution well and wait until the powder is completely dissolved;
- Wait 30 minutes before performing the test

Trascorsi i 30 minuti e misurato il pH (9,85 a 22,5°C) / After 30 minutes and measuring of the pH (9.85 at 22.5°C).

Il test viene ritenuto valido quando per ogni microorganismo sono soddisfatte le seguenti condizioni / Test is considered valid when the following conditions are satisfied for each microorganism:

Tabella / Table 2.3.1 – Condizioni del test / Test conditions

Sospensione/ Suspension	Descrizione /Description	Requisito / Requirement
N	Concentrazione sospensione per il test/Concentration of the suspension in the test	1.5×10^7 - 5.0×10^7 CFU/ml
Nv	Concentrazione sospensione di validazione/Concentration of the suspension in the validation	3.0×10^2 - 1.6×10^3 CFU/ml
Nvb	Concentrazione sospensione per la validazione dell'azione del neutralizzante (test B)/Concentration of the suspension in the neutralizer validation (test B)	3.0×10^4 - 1.6×10^5 CFU/ml
No	Concentrazione della sospensione all'inizio del tempo di contatto nel test, ricavato da N/Concentration of the suspension in the test (at T_0), calculated from N	N / 10

Pag. 7 a 14

EuroLab S.r.l.

- inserito negli elenchi del Ministero della Salute con Prot. n. 600.5/59.735/3102).
- Iscritto al n.6 del Registro Regionale dei Laboratori di Analisi per l'autocontrollo nelle Aziende Alimentari

- Approvato dalla Regione Calabria per l'istituzione di percorsi formativi degli alimentaristi ed operatori del settore alimentare (OSA)
- Laboratorio accreditato ACCREDIA n° 0843 solo per le prove soggette ad accreditamento

Sede Legale: Viale Mare Ionio, 4 – 89040

Marina di Caulonia (RC) – P.I. 02052720808

e-mail:eurolab_srl@libero.it

www.eurolab-srl.it

Tel./Fax 0964/82185

Mob. 3929622100

Nvo	Concentrazione della sospensione all'inizio del tempo di contatto nella validazione, calcolato da Nv / Concentration of the suspension in the validation (at To), calculated from Nv	Nv/10
-----	--	-------

2.4 VALUTAZIONE DEI RISULTATI / EVALUATION OF RESULTS

risultati ottenuti nei controlli della convalida devono soddisfare i seguenti requisiti/Validation test results shall meet the following requirements:

Tabella / Table 2.3.2 – Criteri per la valutazione dei risultati / Acceptance criteria for results Evaluation

Risultato del controllo/ Result of the control	Descrizione /Description	Requisito /requirement (CFU/ml)
A	Validazione del metodo /Method validation	> Nvo/2
B	Verifica dell'assenza di tossicità del neutralizzante /Neutralizer toxicity verification	> Nvo/2 e > Nvb/2000
C	Validazione del neutralizzante (capacità di bloccare l'azione del prodotto) / Neutralizer validation (neutralization efficacy evaluation)	> Nvo/2

Se i requisiti dei controlli A e/o B sopra indicati non sono soddisfatti il metodo non è applicabile in quanto presenta effetti letali per i ceppi testati. Se i requisiti del controllo C sopra indicato non sono soddisfatti il metodo non è applicabile in quanto il neutralizzante non è in grado di bloccare l'azione del prodotto.

If test A and/or B are not satisfied the method is not applicable because of lethal effects on microorganisms. If test C requirements are not satisfied the method is not applicable since the neutralizer doesn't interrupt the product action.

L'efficacia del trattamento viene valutata in base all'abbattimento logaritmico $R = \text{valore dell'attività antimicrobica}$. / activity is evaluated according to the logarithmic reduction $R = \text{value of antimicrobial activity}$.

Per calcolare l'abbattimento logaritmico per ciascuna concentrazione testata e per ogni microorganismo viene utilizzata la seguente formula / The logarithmic reduction is calculated for each tested product concentration and microorganism as follows:

$$\text{Log } R = \text{log } N_o - \text{log } N_a$$

Dove/where

R: abbattimento logaritmico / logarithmic reduction

No: numero di microorganismi inoculati espresso in CFU/ml (vedere tabella 2.3.1), No deve essere compreso tra 1.5×10^7 - 5.0×10^7 CFU/ml/ number of inoculated microorganisms CFU/ml (ref. Table 2.3.1), No must be within the range 1.5×10^7 - 5.0×10^7 CFU/ml

Na: numero di microorganismi (CFU/ml) sopravvissuti alla fine del tempo di contatto prima della neutralizzazione / number of surviving microorganisms (CFU/ml) at the end of the contact time before the neutralization.

Nel caso in cui il risultato sia espresso considerando i valori ottenuti in due diluzioni successive il rapporto dei valori deve essere compreso tra 5 e 15. / For results calculated by the results of two subsequent dilutions, the quotient of the results shall be within the range 5 - 15.

Il campione viene considerato battericida quando mostra un abbattimento della carica microbica di almeno 5 log rispetto all'inoculo a 20°C in presenza di sostanze interferenti dopo il tempo di contatto definito. / The sample is considered bactericidal when shows a decrease in microbial growth of at least 5 log with respect to the inoculum, at 20°C in the presence of interfering substances after a defined contact time.

3 RISULTATI E CONCLUSIONI / RESULTS AND CONCLUSIONS

3.1 RISULTATI / RESULTS

Le soluzioni di test sono risultate stabili nel corso dell'intera procedura/ The test solutions were stable throughout the entire procedure.

Concentrazione delle sospensioni N, Nv e Nvb utilizzate nei test / Concentration of the suspensions N, Nv and Nvb for the tests

Ceppo/strain	N (CFU/ml)	Requisito /requirement	Conforme/ Conform	Nv (CFU/ml)	Requisito /requirement	Conforme/ Conform
Clostridium difficile	1.9 x 10 ⁷	1.5 - 5.0 x 10 ⁷ CFU/ml	Si/Yes	4.8 x 10 ²	3.0 x 10 ² - 1.6 x 10 ³ CFU/ml	Si/Yes
Bacillus subtilis	2.1 x 10 ⁷		Si/Yes	5.0 x 10 ²		Si/Yes
Bacillus cereus	2.6 x 10 ⁷		Si/Yes	1.1 x 10 ³		Si/Yes

Ceppo/strain	Nvb (CFU/ml)	Requisito/requirement	Conforme/Conform
Clostridium difficile	4.8 x 10 ⁴	3.0 x 10 ⁴ - 1.6 x 10 ⁵ CFU/ml	Si/Yes
Bacillus subtilis	5.0 x 10 ⁴		Si/Yes
Bacillus cereus	1.1 x 10 ⁵		Si/Yes

Risultati della validazione del test /Test validation results

Ceppo/strain	Test	Descrizione /Description	Requisito /requirement (CFU/ml)	Risultato/Result	Conforme/ conform
Clostridium difficile Nvo = 50*	A	Validazione del metodo /Method validation	≥25	75	Si/Yes
	B	Verifica dell'assenza di tossicità del neutralizzante /Neutralizer toxicity verification	≥25	85	Si/Yes
	C	Validazione del neutralizzante (capacità di bloccare l'azione del prodotto) / Neutralizer validation (neutralization efficacy evaluation)	≥25	87	Si/Yes

Ceppo/strain	Test	Descrizione /Description	Requisito /requirement (CFU/ml)	Risultato/Result	Conforme/ conform
Bacillus subtilis Nvo =30 *	A	Validazione del metodo /Method validation	≥15	48	Si/Yes
	B	Verifica dell'assenza di tossicità del neutralizzante /Neutralizer toxicity verification	≥15	36	Si/Yes
	C	Validazione del neutralizzante (capacità di bloccare l'azione del prodotto) / Neutralizer validation (neutralization efficacy evaluation)	≥15	35	Si/Yes

Ceppo/strain	Test	Descrizione /Description	Requisito /requirement (CFU/ml)	Risultato/Result	Conforme/ conform
Bacillus cereus Nvo = 140 *	A	Validazione del metodo /Method validation	≥70	91	Si/Yes
	B	Verifica dell'assenza di tossicità del neutralizzante /Neutralizer toxicity verification	≥70	96	Si/Yes
	C	Validazione del neutralizzante (capacità di bloccare l'azione del prodotto) / Neutralizer validation (neutralization efficacy evaluation)	≥70	101	Si/Yes

*calcolato da Nv/10 / obtained from Nv/10

I risultati ottenuti dimostrano che il metodo ed il neutralizzante utilizzato non interferiscono nel test e che il neutralizzante blocca l'azione del prodotto. /The obtained results show that the testing conditions and the neutralizer do not interfere in the test and the neutralizer is able to stop the product action.

Risultati del test per la valutazione dell'attività sporicida / Testing results for the evaluation of the sporicidal activity

Concentrazione prodotto 100% / Product concentration 100% (4,5 g/l)

Ceppo/strain	No (CFU/ml)	Na (CFU/ml)	Riduzione della conta microbica/Microbial count reduction (Log R = log No - log Na)	Valutazione / Evaluation
Clostridium difficile	1.9 x 10 ⁷	1.0 x 10 ³	7.28 - 3.00 = 4.28	Efficace/Effective
Bacillus subtilis	2.1 x 10 ⁷	1.1 x 10 ³	7.32 - 3.04 = 4.28	Efficace/Effective
Bacillus cereus	2.6 x 10 ⁷	1.0 x 10 ³	7.41 - 3.00 = 4.41	Efficace/Effective

Concentrazione prodotto 50% / Product concentration 50% (2.25 g/l)

Ceppo/strain	No (CFU/ml)	Na (CFU/ml)	Riduzione della conta microbica/Microbial count reduction (Log R = log No - log Na)	Valutazione / Evaluation
Clostridium difficile	1.9 x 10 ⁷	1.2 x 10 ³	7.28 - 3.08 = 4.20	Efficace/Effective
Bacillus subtilis	2.1 x 10 ⁷	1.4 x 10 ³	7.32 - 3.15 = 4.17	Efficace/Effective
Bacillus cereus	2.6 x 10 ⁷	1.3 x 10 ³	7.41 - 3.11 = 4.30	Efficace/Effective

Concentrazione prodotto 1% / Product concentration 1% (0.045 g/l)

Ceppo/strain	No (CFU/ml)	Na (CFU/ml)	Riduzione della conta microbica/Microbial count reduction (Log R = log No - log Na)	Valutazione / Evaluation
Clostridium difficile	1.9 x 10 ⁷	3.1 x 10 ⁴	7.28 - 4.49 = 2.79	Non efficace / Not effective
Bacillus subtilis	2.1 x 10 ⁷	3.2 x 10 ⁴	7.32 - 4.51 = 2.81	Non efficace / Not effective
Bacillus cereus	2.6 x 10 ⁷	3.8 x 10 ⁴	7.41 - 4.58 = 2.83	Non efficace / Not effective

3.2 CONCLUSIONI / CONCLUSIONS

Sulla base dei risultati sopra riportati il prodotto: / on the base of the results above reported, the product:

EC STER - Concentrazione 0,45% = 4,5 g/l

Lotto/Batch: S5/22

Ha dimostrato una riduzione di 4 log della popolazione microbica sui ceppi testati ed è quindi risultato avere azione sporicida con un tempo di contatto di 1 minuti alla concentrazione del 100% (v/v) in condizioni di pulito; la stessa efficacia viene mostrata al 50% della concentrazione / It demonstrated a 4 log reduction of the microbial population on the strains tested and was therefore found to have a sporicidal action with a contact time of 1 minute at a concentration of 100% (v/v) in clean conditions; the same efficacy is shown at 50% of the concentration.

Data 15/01/2023



Dottore Giuseppe Chindemi
Direttore del Laboratorio
Giuseppe Chindemi

4 BIBLIOGRAFIA

UNI EN 17126:2019 - Disinfettanti chimici ed antisettici - Test quantitativo in sospensione per la valutazione dell'attività sporicida dei disinfettanti chimici in campo medico - Metodo di prova e requisiti (fase 2, step 1)

UNI EN 17126:2019 - Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of the sporicidal activity of chemical disinfectants in the medical field - Test method and requirements (phase 2, step 1)