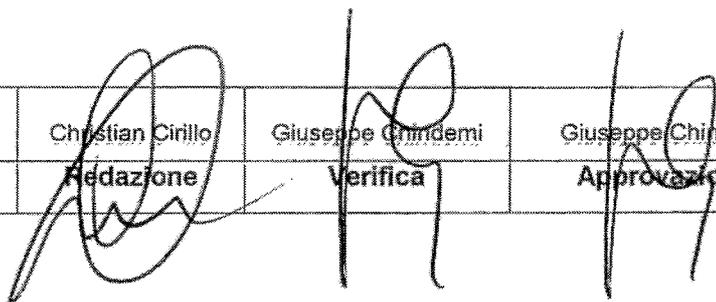


Spett
 ICM SRL
 C.DA TORRE SNC - 89040
 PORTIGLIOLA (RC) ITALY

**VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA'
 LIEVITICIDA O FUNGICIDA DI
 DISINFETTANTI CHIMICI E ANTISETTICI
 PROVA QUANTITATIVA IN SOSPENSIONE
 (FASE 2, STADIO 1)
 SECONDO NORMA UNI EN 13624:2022
 EVALUATION OF YEASTICIDAL OR
 FUNGICIDAL ACTIVITY OF CHEMICAL
 DISINFECTANTS AND ANTISEPTICS
 QUANTITATIVE SUSPENSION TEST (PHASE 2,
 STEP 1) ACCORDING TO UNI EN 13624:2022**

0	21/12/2022	1° Emissione	Christian Cirillo	Giuseppe Chindemi	Giuseppe Chindemi
Rev.	Data	Causale	Redazione	Verifica	Approvazione



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	5
2.3 CONDIZIONI DEL TEST / TESTING CONDITIONS	6
2.4 VALUTAZIONE DEI RISULTATI / EVALUATION OF RESULTS	7
3 RISULTATI E CONCLUSIONI / RESULTS AND CONCLUSIONS	9
3.1 RISULTATI / RESULTS	9
3.2 CONCLUSIONI / CONCLUSIONS	11
4 BIBLIOGRAFIA	12

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	4472/22-05	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%-50%-1%

1.2 TEST / ASSAY

Test per la valutazione dell'attività fungicida o lieviticida di disinfettanti chimici e prodotti antisettici in accordo alla norma UNI EN 13624:2022.

Evaluation of fungicidal or yeasticidal activity of chemical disinfectants and antiseptic products according to UNI EN 13624:2022.

1.3 DATE DELLO STUDIO / STUDY DATES

Inizio / Start: 13/12/2022

Fine / End: 16/12/2022

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 la disinfezione delle superfici senza risciacquo (prodotto pronto all'uso), possiede attività lieviticida e/o fungicida.

La norma UNI EN 13624:2022 stabilisce il metodo per verificare tale attività e i requisiti minimi. L'attività viene valutata con una prova in sospensione verso *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. L'azione lieviticida e/o fungicida è dimostrata quando il prodotto mostra una riduzione di almeno 4 logaritmi del microrganismo testato 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 lieviticida e/o fungicida viene testata su tre concentrazioni di prodotto.

The aim of the test is to establish whether a chemical disinfectant or antiseptic product, physically stable in water, and intended for medical use in the hand disinfection (hand-rub products) has yeasticidal and/or fungicidal activity.

The standard UNI EN 13624:2022 defines the method and requirements to verify this activity. The activity is evaluated with a suspension test against *Candida albicans* ATCC 10231 and *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. The yeasticidal and/or fungicidal activity is demonstrated when the product shows a 4 log reduction of the inoculum after a defined contact time, at 20°C and in the presence of interfering substances to simulate the use. The yeasticidal and/or fungicidal activity is tested on three (3) product concentrations.

Tabella / Table 2.1.1 – Condizioni del test / Test conditions

Condizioni del test/ Test conditions	Attività battericida/Bactericidal activity
Ceppo testato / Tested strain	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus brasiliensis</i>
Temperatura di test /Test temperature	20°C Temperature ambiente/ room temperature 18-25°C
Tempo di contatto / Contact time	1 minuto/minute
Condizioni di pulito / Clean condition	0,3 g/l bovine serum albumin
Riduzione logaritmica / Log reduction	≥ 4 Log
Diluizione del campione / Dilution of the sample	100-50-1%
Temperatura di incubazione del test/ Test incubation temperature	30 ± 1°C strains

2.2 CEPPO UTILIZZATO E METODICA / USED STRAIN AND METHOD

I ceppi utilizzati sono stati subcoltivati a partire dalla coltura madre come descritto nella norma, ma diluiti in acqua sterile come richiesto dal cliente, in modo tale da non fare entrare il prodotto in contatto con residui di nutrienti o altre sostanze.

The strains used were sub-cultivated starting from the mother culture as described in the standard, but diluted in sterile water as requested by the customer, so as not to let the product come into contact with residual nutrients or other substances.

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)
Candida albicans ATCC 10231	Malt extract agar (MEA) 30±1°C – 48 h	1,5 – 5,0 X 10 ⁸	6.0 X 10 ⁷
Aspergillus brasiliensis ATCC 16404			2.5 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 doesn't 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

Peptone

Water

2.3 CONDIZIONI DEL TEST / TESTING CONDITIONS

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

- Agitare bene il flaconcino prima dell'apertura;
- Versare l'intero flacone di polvere in un contenitore pulito e solubilizzarla 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, conservando la soluzione in un contenitore ben chiuso.

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

- Shake the vial well before opening;
- 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) si procede con il test / After 30 minutes and having measured the pH (9.85 at 22.5°C), proceed with the test.

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	1.5x10 ⁷ -5.0x10 ⁷ CFU/ml
Nv	Concentrazione sospensione di validazione/Concentration of the suspension in the validation	3.0x10 ² -1.6 x10 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)	3.0x10 ² -1.6 x10 ³ 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 To), calculated from N	N / 10
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

I 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 > 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 $R = \text{valore dell'attività lieviticida}$. / The activity is evaluated according to the logarithmic reduction $R = \text{value of yeasticidal activity}$.

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

$$\text{Log R} = \text{log No} - \text{log Na}$$

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 $1.5 \times 10^6 - 5.0 \times 10^6$ CFU/ml / number of inoculated microorganisms CFU/ml (ref. Table 2.3.1), No must be within the range $1.5 \times 10^6 - 5.0 \times 10^6$ 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 lieviticida e/o fungicida quando mostra un abbattimento della carica di almeno 4 log rispetto all'inoculo a 20°C in presenza di sostanze interferenti dopo il tempo di contatto definito. / The sample is considered yeasticidal and/or fungicidal when shows a decrease in the growth of at least 4 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
Candida albicans	6,0 X 10 ⁷	1.5-5.0x10 ⁷ CFU/ml	Si/Yes	4.5X10 ²	3.0x10 ² -1.6 x10 ³ CFU/ml	Si/Yes
Aspergillus brasiliensis	5,5 X 10 ⁷		Si/Yes	3.0X10 ²		Si/Yes

Ceppo/strain	Nvb (CFU/ml)	Requisito /requirement	Conforme /Conform
Candida albicans	4.5X10 ⁴	3.0x10 ⁴ -1.6 x10 ⁵ CFU/ml	Si/Yes
Aspergillus brasiliensis	3.0X10 ²		Si/Yes

Risultati della validazione del test /Test validation results

Ceppo/strain	Test	Requisito /requirement	Requisito /requirement	Risultato/ Result	Conforme /Conform
Candida albicans Nvo = 45*	A	Validazione del metodo /Method validation	≥23	32	Si/Yes
	B	Verifica assenza tossicità neutralizzante /Neutralizer toxicity verification	≥23	28	Si/Yes
	C	Validazione dell'attività del neutralizzante/ Neutralizer efficacy validation	≥23	30	Si/Yes

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

Ceppo/strain	Test	Requisito /requirement	Requisito /requirement	Risultato/ Result	Conforme /Conform
Aspergillus brasiliensis Nvo = 30*	A	Validazione del metodo /Method validation	≥15	35	Si/Yes
	B	Verifica assenza tossicità neutralizzante /Neutralizer toxicity verification	≥15	43	Si/Yes
	C	Validazione dell'attività del neutralizzante/ Neutralizer efficacy validation	≥15	30	Si/Yes

I risultati ottenuti dimostrano che il metodo ed il neutralizzante utilizzato non interferiscono nel test e che il neutralizzante blocca l'azione del prodotto. Il metodo risulta validato. /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. The method is validated.

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

Concentrazione prodotto 100% (v/v) / Product concentration 100% (v/v) (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
Candida albicans	6,0 X 10 ⁶	<1,4 X 10 ²	6.78 – (< 2.15) = > 4.63	Efficace / Effective
Aspergillus brasiliensis	5,5 X 10 ⁷	>1.65X10 ³	7.74 – (> 3.22) = 4.52	efficace / effective

Concentrazione prodotto 50% (v/v) / Product concentration 50% (v/v) (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
Candida albicans	6,0 X 10 ⁶	<1,4 X 10 ²	6.78 – (< 2.15) = > 4.63	efficace / effective
Aspergillus brasiliensis	5,5 X 10 ⁷	>1.65X10 ³	7.74 – (> 3.22) = 4.52	efficace / effective

Concentrazione prodotto 1% (v/v) / Product concentration 1% (v/v) (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
Candida albicans	6,0 X 10 ⁶	>3.3 X 10 ²	6.78 - (>6.52) = <0.16	Non efficace / Not effective
Aspergillus brasiliensis	2.5 X 10 ⁶	>1.65X10 ⁶	6.40 - (> 6.22) = <0.18	Non efficace / Not effective

3.2 CONCLUSIONI / CONCLUSIONS

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

EC STER 6722- Concentrazione 0,45% = 4,5 g/l

Lotto/Batch: S5/22

Ha dimostrato una riduzione di 4 log della popolazione microbica su Candida albicans e Aspergillus brasiliensis ed è quindi risultato avere azione lieviticida e fungicida con un tempo di contatto di 1 minuto alla concentrazione del 100% (v/v) e 50 % (v/v) in condizioni di pulito (BSA 0,3g/l) / Demonstrated a 4 log reduction in microbial population on Candida albicans and Aspergillus brasiliensis and was therefore found to have yeasticidal and fungicidal action with a contact time of 1 minute at a concentration of 100% (v/v) and 50% (v/v) in clean conditions (BSA 0.3g/l)

Data 22/12/2022

Il Direttore del Laboratorio
Giuseppe Chindemi

4 BIBLIOGRAFIA

UNI EN 13624:2022- Disinfettanti chimici ed antisettici - Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività fungicida o lieviticida in campo medico - Metodo di prova e requisiti (fase 2, stadio 1) / Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 1).

- 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