

Spett

ICM SRL

C.DA TORRE SNC - 89040

PORTIGLIOLA (RC) ITALY

**DISINFETTANTI CHIMICI ED ANTISETTICI -
TEST QUANTITATIVO IN SOSPENSIONE PER
LA VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI UN
SISTEMA DI STERILIZZAZIONE A FREDDO
CON RADICALI LIBERI
METODO INTERNO - CONDIZIONE DI
SPORCO**

**CHEMICAL DISINFECTANTS AND
ANTISEPTIC - QUANTITATIVE SUSPENSION
TEST FOR EVALUATING THE ACTIVITY OF A
COLD STERILIZATION SYSTEM WITH FREE
RADICALS
INTERNAL METHOD - DIRTY CONDITION**

0	17/04/2023	1° Emissione	Christian Cirillo	Giuseppe Chindemi	Giuseppe Chindemi
Rev.	Data	Causale	Redazione	Verifica	Approvazione

Pag. 1 a 13

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	12
4 BIBLIOGRAFIA.....	13

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

Diluente 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 al metodo interno sviluppato.

Test for the evaluation of the sporicidal activity of chemical disinfectants and antiseptic products according to the developed internal method.

1.3 DATE DELLO STUDIO / STUDY DATES

Inizio / Start: 07/04/2023

Fine / End: 17/04/2023

2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE / STUDY DESIGN

2.1 SCOPO DEL TEST / PURPOSE OF THE TEST

Questo documento descrive un metodo di prova per valutare l'attività di sterilizzazione a freddo mediante l'impiego di Radicali Liberi nell'area e campi descritti nel campo di applicazione senza azione meccanica. Il test di laboratorio simula fedelmente le condizioni pratiche di applicazione. Le Condizioni scelte (tempo di contatto, temperatura e microrganismi) riflettono parametri che si trovano normalmente nelle pratiche comuni di lavoro che possono influenzare l'azione dei disinfettanti.

Tuttavia, per alcune applicazioni le raccomandazioni d'uso di un prodotto possono differire e quindi devono essere utilizzate condizioni di test aggiuntive.

Questo documento non è destinato all'uso di sistemi automatici di aerosolizzazione; in tali casi, vedere EN 17272.

This document describes a test method for evaluating the cold sterilization activity by the use of Free Radicals in the area and fields described in the field of application without mechanical action. The laboratory test faithfully simulates the practical conditions of application. The selected conditions (contact time, temperature and microorganisms) reflect parameters that are normally found in common work practices that can influence the action of disinfectants.

This document is not intended for use in automated aerosol systems; in such cases, see EN 17272.

Tabella / Table 2.1.1 – Condizioni del test / Test conditions

Condizioni del test/ Test conditions	Attività battericida/Bactericidal activity
Ceppo testato / Tested strain	Bacillus cereus
Temperatura di test / Test temperature	Temperature ambiente/ room temperature 18-25°C
Tempo di contatto / Contact time	30 s; 60 s; 2 min; 10 min su richiesta del cliente/ on customer request
Condizioni di sporco / dirty conditions	6 g/l di sangue trattato con EDTA (anticoagulante) / 6 g/l of blood treated with EDTA (anticoagulant)
Riduzione logaritmica / Log reduction	≥ 8 Log
Diluizione del campione / Dilution of the sample	100%
Temperatura di incubazione del test/ Test incubation temperature	Bacillus cereus 36 ± 1°C / 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 dal metodo, in modo tale da non fare entrare il prodotto in contatto con residui di nutrienti o altre sostanze.

The strain used has been subcultivated from the mother culture as described by the method, 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)
Bacillus cereus ATCC 9634	Tryptic soy agar (Incubare le piastre per minimo 4 e massimo 7 giorni a 36 °C + 1 °C (o 37 °C + 1 °C)) (Incubate the plates for minimum 4 and maximum 7 days at 36 °C + 1 °C (or 37 °C + 1 °C))	> 10 ⁸	3.0 x 10 ⁸

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

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

Tabella / Table 2.2.2 – Soluzione Neutralizzante / Neutralizer composition

Tween 80	30 g
Lecitina di soia	1 g
L-histidin	1 g
Sodium thiosulphate	5 g
Water	1000 ml

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 (9,65 a 22,5°C) si procede con il test / After 30 minutes and having measured the pH (9.65 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

Descrizione /Description	Requisito / Requirement
Concentrazione sospensione per il test/Concentration of the suspension in the test	3.0×10^8 CFU/ml
Concentrazione sospensione di validazione/Concentration of the suspension in the validation	3.0×10^8 CFU/ml
Concentrazione sospensione per la validazione dell'azione del neutralizzante /Concentration of the suspension in the neutralizer validation	3.0×10^8 CFU/ml

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

Descrizione /Description	Requisito /requirement (CFU/ml)
Validazione del metodo /Method validation	$> 10^8$
Verifica dell'assenza di tossicità del neutralizzante /Neutralizer toxicity verification	$> 10^8$
Validazione del neutralizzante (capacità di bloccare l'azione del prodotto) / Neutralizer validation (neutralization efficacy evaluation)	Nessuna crescita/ No growth

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

If the requirements of the controls indicated above are not satisfied, the method is not applicable as it has lethal effects for the tested strains and therefore not applicable as the neutralizer is not able to block the action of the product.

L'efficacia del trattamento viene valutata in base all'abbattimento logaritmico = valore dell'attività antimicrobica. / activity is evaluated according to the logarithmic reduction = 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:

$$\text{Log R} = \log N_0 - \log N_a$$

Dove/where

R: abbattimento logaritmico / logarithmic reduction

No: numero di microorganismi inoculati espresso in CFU/ml/ number of inoculated microorganisms expressed in 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.

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

3 RISULTATI E CONCLUSIONI / RESULTS AND CONCLUSIONS

3.1 RISULTATI / RESULTS

Le soluzioni del 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
Bacillus cereus	3.0×10^8	$> 10^8$ CFU/ml	Sì/Yes	3.0×10^8	$> 10^8$ CFU/ml	Sì/Yes

Risultati della validazione del test /Test validation results

Ceppo/strain	Descrizione /Description	Requisito /requirement (CFU/ml)	Risultato/Result	Conforme/ conform
Bacillus cereus	Validazione del metodo /Method validation	$> 10^8$	3.0×10^8	Sì/Yes
	Verifica dell'assenza di tossicità del neutralizzante /Neutralizer toxicity verification	$> 10^8$	3.0×10^8	Sì/Yes
	Validazione del neutralizzante (capacità di bloccare l'azione del prodotto) / Neutralizer validation (neutralization efficacy evaluation)	Nessuna crescita/ No growth	Nessuna crescita/ No growth	Sì/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. /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

Risultati del test / Testing results - Concentrazione di partenza / starting concentration

diluizione	ufc/ml	lg
10 ⁷	>300	-
10 ⁸	300	300000000
10 ⁹	30	300000000
10 ¹⁰	3	300000000

Concentrazione prodotto 100%/ Product concentration 100% (4,5 g/l) (condizioni di sporco / dirty condition)

N° colonie rilevate – tempo di contatto 30 s			N° colonie rilevate – tempo di contatto 60 s			N° colonie rilevate – tempo di contatto 2 min			N° colonie rilevate – tempo di contatto 10 min		
ufc/ml	ufc/ml	lg	ufc/ml	ufc/ml	lg	ufc/ml	ufc/ml	lg	ufc/ml	ufc/ml	lg
>300	>300	-	1 x 10 ⁰	>300	-	0 x 10 ⁰	0	0	0 x 10 ⁰	0	0
60	6.0 x 10 ¹	1.78	4.0 x 10 ¹	40	1.60	0 x 10 ¹	0	0	0 x 10 ¹	0	0
6	6.0 x 10 ²	2.78	4.0 x 10 ²	4	2.60	0 x 10 ²	0	0	0 x 10 ²	0	0

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
Bacillus cereus	3.0 x 10 ⁸	3.0 x 10 ⁸	8.48 – 8.48 = 0	Efficace/Effective

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

3.2 CONCLUSIONI / CONCLUSIONS

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

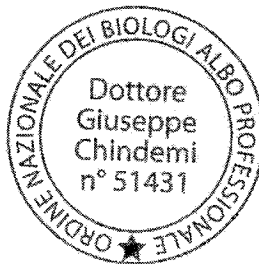
EC STER - Concentrazione 0,45% = 4,5 g/l

Lotto/Batch: S5/22

Ha dimostrato una riduzione di > 8 log della popolazione microbica sui ceppi testati ed è quindi risultato avere azione sterilizzante già al tempo di contatto di 2 min alla concentrazione del 100% (v/v) in condizioni di sporco (6 g/l di sangue trattato con EDTA (anticoagulante)). Il prodotto a 30 s ha un'abbattimento di 6.70 log, a 60 s ha un abbattimento di 6.88;

It demonstrated a > 8 log reduction of the microbial population on the strains tested and was therefore found to have a sterilizing action already at a contact time of 2 min at a concentration of 100% (v/v) in dirty conditions (6 g/l of blood treated with EDTA (anticoagulant)). The product at 30 s has a reduction of 6.70 log, 60 s has a reduction of 6.88;

Data 17/04/2023



Il Direttore del Laboratorio
Giuseppe Chindemi

4 BIBLIOGRAFIA

UNI EN 13727:2015 Disinfettanti chimici ed antisettici – Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività battericida in area medica – Metodo di prova e requisiti (fase 2, stadio 1)

UNI EN 13624:2022 Disinfettanti chimici ed antisettici – Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività fungicida o levuricida in campo medico – Metodo di prova e requisiti (fase 2, stadio 1)

UNI EN 14476:2019 Disinfettanti chimici e antisettici – Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività virucida in area medica – Metodo di prova e requisiti (Fase 2/Stadio 1)

UNI EN 14348:2005 Disinfettanti chimici ed antisettici – Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività mico- battericida dei disinfettanti chimici nel campo medico, compresi i disinfettanti per strumenti – Metodi di prova e requisiti (fase 2/stadio 1)

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 2)

UNI EN 17387:2021 Disinfettanti chimici ed antisettici – Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività battericida, levuricida e/o fungicida di disinfettanti chimici in area medica, su superfici non porose senza azione meccanica – Metodo di prova e requisiti (fase 2, stadio 2)