



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