



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 16<sup>th</sup> 2009*

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

Viale Industria, 16/18

24060 Caselli Calepio (BG)

**INDICE / CONTENTS:**

<b>INTRODUZIONE / FOREWORD</b>	pag./ page	3
<b>1 - TERMINI E DEFINIZIONI / TERMS AND DEFINITIONS</b>	pag./ page	4
<b>2 - CARATTERIZZAZIONE DEL PRODOTTO / PRODUCT IDENTITY</b>	pag./ page	5
<b>Valutazione dell'efficacia virucida / Evaluation of the virucidal efficacy.</b>		
<b>Prova quantitativa in sospensione virucida per disinfettanti e antisettici – Metodi di prova e requisiti della Norma UNI EN 14476: 2007 (Fase 2 – stadio 1) /</b>		
<b>Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectant and antiseptics – Test method and requirements European Standard EN 14476:2007( Phase 2- Step 1):</b>		
<b>3-PROCEDURA SPERIMENTALE / EXPERIMENTAL PROCEDURE</b>	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
<b>4 – CONDIZIONI SPERIMENTALI / EXPERIMENTAL CONDITIONS</b>	pag./ page	9
<b>5 – METODO DI PROVA / TEST METHOD</b>	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
<b>6 – CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI / CALCULATION AND EXPRESSION OF RESULTS</b>	pag./ page	13
<b>7 – VERIFICA DEL METODO / VERIFICATION OF THE METHODOLOGY</b>	pag./ page	13
<b>8 – RISULTATI / RESULTS</b>	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
<b>9 – CONCLUSIONI / CONCLUSIONS</b>	pag./ page	18
<b>10 – APPENDICE / ANNEX</b>	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.*

**ID<sub>50</sub>:** 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).

**ID<sub>50</sub>:** *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 stato 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 ottenuto 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 MgCl<sub>2</sub> and 46,24 g anhydrous CaCl<sub>2</sub> in water and dilute to 1000 ml.

MgCl <sub>2</sub> anidro	19,84 g	MERCK
CaCl <sub>2</sub>	46,24 g	MERCK
Acqua distillata	1000 ml	

-Soluzione B: / -Solution B: dissolve 35,02 g  $\text{NaHCO}_3$  in water and dilute to 1000 ml.

$\text{NaHCO}_3$	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  $\mu\text{m}$ . / *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  $\mu\text{m}$ .*

### 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 - streptomicina (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  $\text{H}_2\text{O}$  distillata. Si porta a pH 7,4  $\pm$  0,2 aggiungendo HCl. Si aggiunge  $\text{H}_2\text{O}$  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;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,15 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 g; acqua distillata fino ad 800 ml); e poi  $\text{H}_2\text{O}$  distillata fino ad 1 litro.

*Add the Phosphate Buffered Saline PBS –A (dissolve 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,15 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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 CO<sub>2</sub> (5%) in grado di mantenere la temperatura a 36°C ± 1°C. / *CO<sub>2</sub> incubator (95% air, 5% CO<sub>2</sub>), 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 CO<sub>2</sub> al 5%.

*The cell line established is cultivated at 37°C in a humid atmosphere under 5% CO<sub>2</sub> 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  $5 \times 10^5$  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  $1 \times 10^7$ . 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 TCID<sub>50</sub>) 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  $10^7$  ID<sub>50</sub>/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  $5 \times 10^5$  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 ID<sub>50</sub>) 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 ID<sub>50</sub>) 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 10<sup>2</sup> to 10<sup>10</sup> 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 log<sub>10</sub>. 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 ID<sub>50</sub>) 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<sup>-6</sup> 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<sup>-9</sup> in an ice bath.

**6- CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI. / CALCULATION AND EXPRESSION OF RESULTS****6.1- Determinazione del titolo di infettività (ID<sub>50</sub>). / Calculation of infectivity titer (ID<sub>50</sub>/PFU).**

L'attività infettante è stata determinata con il metodo Spaerman - Kärber, che utilizza la seguente formula per il calcolo del valore ID<sub>50</sub>:

$-\log_{10} ID_{50} = - (x_0) - \{ [ R/100 ] - 0,5 \} \times \log_{10}$  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 log<sub>10</sub> (Riduzione del 99,999%)**.

*The appropriate method of calculation is Spaerman – Kärber method.*

*The ID<sub>50</sub> 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 log<sub>10</sub> 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 log<sub>10</sub> 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 ID<sub>50</sub> tra le colture cellulari trattate con il prodotto in esame e quelle non trattate con il prodotto in esame deve essere <1 log<sub>10</sub>.

*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 log<sub>10</sub> of virus titre.*

**7.2 - VERIFICA SOPPRESSIONE DISINFETTANTE / VALIDITY INACTIVATION TEST DISINFECTANT**

La differenza del valore ID<sub>50</sub> tra le colture cellulari trattate con il prodotto in esame inattivato e quelle trattate solo con l'inoculo virale deve essere ≤0,5 log<sub>10</sub>.

*The comparative virus titration on cells treated with inactivated product and cell treated with viral suspension, result in a difference ≤0,5 log<sub>10</sub> of virus titre.*

**7.3 – CONTROLLO INATTIVAZIONE VIRALE / REFERENCE VIRUS INACTIVATION TEST.**

La differenza del valore ID<sub>50</sub> 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 log<sub>10</sub> e 4,5 log<sub>10</sub> e dopo 30 minuti di incubazione tra 0,5 log<sub>10</sub> e 2,5 log<sub>10</sub>.

*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<sup>0,5</sup>** (0,5 log) and **10<sup>2,5</sup>** (2,5 log) after 30 min and **10<sup>2</sup>** (2 log) and **10<sup>4,5</sup>** (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**

ID<sub>50</sub> = -7,00 PROVA VALIDA / The test is VALID

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

ID<sub>50</sub> = -7,17 PROVA VALIDA / The test is VALID

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

ID<sub>50</sub> = -7,00 PROVA VALIDA / The test is VALID

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

ID<sub>50</sub> = -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%):ID<sub>50</sub> = -6,83

Titolazione virale su cellule trattate con PBS:ID<sub>50</sub> = -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%):ID<sub>50</sub> = -7,00

Titolazione virale su cellule trattate con PBS:ID<sub>50</sub> = -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%):ID<sub>50</sub> = -6,67

Titolazione virale su cellule trattate con PBS:ID<sub>50</sub> = -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%):ID<sub>50</sub> = -7,00

Titolazione virale su cellule trattate con PBS:ID<sub>50</sub> = -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:ID<sub>50</sub> = -7,17

*Virus titration on cells treated without inactivation test, only addition of PBS:ID<sub>50</sub> = -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:ID<sub>50</sub> = -7,00

*Virus titration on cells treated without inactivation test, only addition of PBS:ID<sub>50</sub> = -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:ID<sub>50</sub> = -7,00

*Virus titration on cells treated without inactivation test, only addition of PBS:ID<sub>50</sub> = -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:ID<sub>50</sub> = -6,83

*Virus titration on cells treated without inactivation test, only addition of PBS:ID<sub>50</sub> = -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:ID<sub>50</sub> = -6,67

Titolazione virale su cellule trattate con virus inattivato con formaldeide dopo 30 minuti:ID<sub>50</sub> = -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:ID<sub>50</sub> = -6,67*

*Virus titration on cells treated with reference inactivation test after 30 min:ID<sub>50</sub> = -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:ID<sub>50</sub> = - 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: ID<sub>50</sub> = - 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 <sub>10</sub> ID <sub>50</sub> )	-log <sub>10</sub> ID <sub>50</sub>				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/ Experimental conditions		Citotossicità/ Cytotoxicity	Titolo sospensione virale/ Titre of the virus control (-log <sub>10</sub> ID <sub>50</sub> )	-log <sub>10</sub> ID <sub>50</sub>				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	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/ <i>Experimental conditions</i>		Citotossicità/ Cytotoxicity	Titolo sospensione virale/ <i>Titre of the virus control</i> (-log <sub>10</sub> ID <sub>50</sub> )	-log <sub>10</sub> ID <sub>50</sub>				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	/		7,17	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 ( <i>Adenovirus</i> )	n.a.	PBS	n.a.	7,17	/	n.d.	n.d.	7,17	n.a.
Virus control ( <i>Adenovirus</i> )	n.a.	0,3 gr/l BSA	n.a.	7,17	/	n.d.	n.d.	7,33	n.a.
Virus control ( <i>Adenovirus</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*

8.2.4 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 <sub>10</sub> ID <sub>50</sub> )	-log <sub>10</sub> ID <sub>50</sub>				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 16<sup>th</sup> 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