



in collaborazione con
prof. P.G.Balboni Università degli Studi
Sezione di Microbiologia

REPORT EFFICACIA FUNGICIDA / FUNGICIDAL EFFICACY TEST

UNI EN 1650:2008

Disinfettanti chimici e antisettici.

Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività fungicida dei disinfettanti chimici ed antisettici in base alla norma.

Chemical disinfectants and antiseptics.

Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas

Metodo di prova e requisiti (Fase 2/ Stadio 1) /

Test method and requirements (phase 2, step 1)

Prodotto / product :

KILL PLUS

		REPORT 03Nettuno/2015 Data: 05/11/2015
--	--	---

Committente / Customer:

NETTUNO SRL

Via Industria, 16/18

24060 CASELLI CALEPIO (BG) - Italy

INDICE / CONTENTS:		Pag. / Page
	DICHIARAZIONE DI CONFORMITÀ ALLE NORME DI BUONA PRATICA DI LABORATORIO / DECLARATION OF CONFORMITY TO STANDARDS OF GOOD LABORATORY PRACTICE	3
	INTRODUZIONE / FOREWORD	4
1	SCOPO / SCOPE	4
2	TERMINI E DEFINIZIONI / TERMS AND DEFINITIONS	5
3	CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE IN ESAME / IDENTIFICATION OF THE PRODUCT	6
4	CONDIZIONI SPERIMENTALI / EXPERIMENTAL CONDITIONS	7
	PARAMETRI SPERIMENTALI / EXPERIMENTAL PARAMETERS	7
4.1	MICROORGANISMI DI PROVA / TEST ORGANISMS	9
4.2	MATERIALI E REAGENTI / MATERIAL AND REAGENT	9
	Soluzioni e reagenti / <i>Culture media and reagents</i>	9
4.3	SOSTANZE INTERFERENTI / INTERFERING SUBSTANCES	11
4.4	APPARECCHIATURA E VETRERIA / USUAL MICROBIOLOGICAL LABORATORY EQUIPMENT	12
5	ESECUZIONE DEL SAGGIO / EXPERIMENTAL PROCEDURE	13
5.1	PROVE PRELIMINARI / PRELIMINARY TESTS	13
5.1.1	Preparazione delle sospensioni micotiche / <i>Fungal suspension</i>	13
5.1.2	Convalida del Metodo Diluizione-Neutralizzazione / <i>Dilution neutralization Method verification:</i>	15
5.1.3	Validazione condizioni sperimentali (A) / <i>Experimental conditions verification (A)</i>	16
5.1.4	Validazione non tossicità del neutralizzante (B) / <i>Neutralizer verification (B)</i>	16
5.1.5	Validità neutralizzazione (C) / <i>Neutralization verification (C)</i>	17
5.2	SAGGIO VERO E PROPRIO: TEST FUNGICIDA – TEST LIEVITICIDA / TEST METHOD: FUNGICIDAL TESTING – YEASTICIDAL TESTING	18
5.3	CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI / CALCULATION AND EXPRESSION OF RESULTS	19
5.4	VERIFICA DELLA METODOLOGIA DI CONVALIDA / VERIFICATION OF THE METHODOLOGY	22
6	RISULTATI / RESULTS	23
7	CONCLUSIONI / CONCLUSIONS	24
	APPENDICE 1 / ANNEX 1: Risultati / Results	25
	Tabella 1: Risultati in Condizione di pulito / <i>Table 1: Results clean condition</i>	
	Tabella 2: Risultati in Condizione di sporco / <i>Table 2: Results dirty condition</i>	



*in collaborazione con
prof. P.G.Balboni Università degli Studi
Sezione di Microbiologia*

**DICHIARAZIONE DI CONFORMITÀ ALLE NORME DI BUONA PRATICA DI
LABORATORIO /DECLARATION OF CONFORMITY TO STANDARDS OF GOOD
LABORATORY PRACTICE**

I metodi di prova in base alle UNI EN 1650:2008, eseguiti per la valutazione in sospensione dell'attività fungicida di prodotti, classificati come disinfettanti chimici ed antisettici, classificati come disinfettanti chimici ed antisettici in campo alimentare, industriale, domestico e nelle collettività, sono stati eseguiti rispettando le regole della Buona Prassi di laboratorio (BPL), comprendente un insieme di regole che garantiscono la qualità delle prove non cliniche sperimentali di laboratorio.

Ogni prova "*in vitro*" viene condotta secondo la Buona Prassi di Laboratorio in conformità alle regolamentazioni vigenti, concernenti il rispetto della sicurezza sul lavoro.

According to UNI EN 1650:2008 the method test for the evaluation in suspension of fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas or medical area, have been carried out following the rules of Good Laboratory Practice (GLP), comprising a set of rules that guarantee the quality of experimental test laboratory. Each test "in vitro" is carried out according to Good Laboratory Practice in accordance with existing regulations regarding the observation of safety at work.

Data: 05/11/2015 / November 05th 2015

(Responsabile scientifico Firma / Signature)

Prof. Pier Giorgio Balboni)
University Of Ferrara Dpt. Medicine
Prof. cultore della materia "Microbiologia"

INTRODUZIONE / FOREWORD

NORMA
EUROPEA /
EUROPEAN
STANDARD

UNI EN 1650:2008 Disinfettanti chimici ed antisettici. Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività fungicida dei disinfettanti chimici ed antisettici usati in campo alimentare, industriale, domestico e nelle collettività. Metodo di prova e requisiti (Fase 2/Stadio 1).

Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas. Test method and requirements (Phase 2, Step 1)

SCOPO / SCOPE

1

La NORMA EUROPEA EN 1650: luglio 2008: Disinfettanti chimici ed antisettici. Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività fungicida dei disinfettanti chimici ed antisettici usati in campo alimentare, industriale, domestico e nelle collettività. Metodo di prova e requisiti (Fase 2 / Stadio 1) è una norma europea applicata ai disinfettanti chimici ed antisettici e descrive un metodo di prova in sospensione per determinare se un disinfettante chimico o un antisettico, presenta o no un'attività fungicida nei campi di applicazione precedentemente indicate.

European Standard EN 1650 (July 2008) is a European standard applied to chemical disinfectants and antiseptics and determine the methods to evaluate the fungicidal efficacy of chemical disinfectants and antiseptics in the area described in the scope.

- 2 TERMINI E DEFINIZIONI / TERMS AND DEFINITIONS**
- 2.1 Prodotto (per disinfezione chimica e/o antisepsi):** Agente chimico, o formulazione chimica, usato come disinfettante chimico o antisettico [EN 1040].
Product (for chemical disinfection and/or antiseptis): chemical agent or formulation used as a chemical disinfectant or antiseptic [EN 1040].
- 2.2 Fungicida:** Prodotto in grado di uccidere i funghi e le relative spore in condizioni definite [EN 1275].
Product which kills vegetative and the fungal spores under defined conditions. Adjective: Fungicidal.
- 2.3 Attività fungicida (EN 1650):** Capacità del prodotto di dare luogo ad una riduzione di almeno 10^4 nel numero di cellule vitali di lievito e di spore di muffa appartenenti rispettivamente alle specie di riferimento di *Candida albicans* e *Aspergillus niger* in condizioni definite dalla presente norma europea.

Fungicidal activity
capability of a product to produce at least a 10^4 reduction in the number of viable yeast cells and fungal spores belonging to reference strains of Candida albicans e Aspergillus niger under conditions defined by this European Standard.
- 2.4 Condizioni di pulito / Clean conditions:** Condizioni di presenza di livelli minimi di materie organiche e/o inorganiche.
Conditions of the presence of minimal levels of organic matter and / or inorganic.
- 2.5 Condizioni di sporco / Dirty conditions:** Condizioni di presenza di un significativo livello di materie organiche e/o inorganiche. /
Conditions of the presence of high levels of organic matter and / or inorganic.
- 2.6 ufc / cfu:** il numero di microrganismi contati in unità formanti colonie (unità vitali), cresciuti su piastre con terreno di coltura in agar. /
Colony forming units.

3 **CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE IN ESAME /**
IDENTIFICATION OF THE PRODUCT:

Denominazione della formulazione in esame:

Name of the product: **KILL PLUS**

DITTA PRODUTTRICE / MANUFACTURER:

NETTUNO SRL

Via Industria, 16/18 - 24060 CASELLI CALEPIO (BG) – Italy

Descrizione del prodotto: Description of the product:

è un prodotto liquido pronto all'uso ad azione disinfettante. /
is a liquid ready to use disinfectant.

Condizioni di stoccaggio: Temperatura ambiente. / Storage conditions: Room temperature.

Composizione / Composition:

Active ingredients:

Didecyl dimethyl ammonium chloride

Benzalkonium chloride

Eccipienti e acqua deionizzata q.b. a 100 gr.

Data ricevimento campione: 30/09/2015

Periodo di Analisi:

Data inizio del test: 05/10/2015 ÷ Data fine test 20/10/2015.

Date of testing: 2015-10-05 End date test: 2015-10-20.

4 **CONDIZIONI SPERIMENTALI / EXPERIMENTAL CONDITIONS** **PARAMETRI SPERIMENTALI / EXPERIMENTALE PARAMETERS**

Temperatura test: è stato eseguito a $+^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. / *Test temperature:* $+20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Concentrazione test: / *Test concentration:*

- 80%
- 40%
- 20%

La concentrazione del prodotto di prova è stata di 1,25 volte la concentrazione d'uso, perché viene diluita al 80% durante la prova e la validazione del metodo.

La soluzione di prova, per i prodotti da diluire prima dell'uso, è stata preparata utilizzando acqua dura ottenendo tre diverse concentrazioni, in modo da includere una concentrazione attiva in grado di avere capacità battericida ed una concentrazione non attiva (corrispondente ad una concentrazione molto bassa in modo da non possedere una attività battericida), in base alle indicazioni della norma UNI EN 1650:2008 (Fase 2/ Stadio 1) per i prodotti da sottoporre prima dell'uso a diluizione.

According to the method of the UNI EN 1650:2008 (Phase 2 / Step 1) the concentration of the test product was 1,25 times the desired test concentration because it is diluted to 80 % during the test and the method validation.

The test dilution for products to be diluted before use, was prepared in hard water at a minimum of three different concentrations to include one concentration in the active range active, corresponding to the concentration capable of have a bactericidal activity, and one concentration in the non-active range, corresponding to the concentration not active capable of not have a bactericidal activity.

Tempo di contatto:

- 10 minuti

4.1 MICRORGANISMI TEST/ TEST ORGANISMS

Microrganismi: *Test organisms*

sono stati utilizzate cellule vegetative di *Candida albicans* e spore di *Aspergillus niger* dei seguenti miceti:

LIEVITO / YEAST:

- *Candida albicans* ATCC 10231*;

MUFFE / MOLDS:

- *Aspergillus niger* ATCC 16404*.

*ATCC (American Type Culture Collections).

The fungicidal activity shall be evaluated using the following two test organisms:

–*Candida albicans* (vegetative cells);

–*Aspergillus niger* (spores).

4.2 MATERIALI E REAGENTI / REAGENTS AND MATERIAL

TERRENO DI COLTURA / MEDIA

I reagenti devono essere puri per analisi e/o adatti per applicazioni microbiologiche.

Agar – estratto di malto (Malt Extract Agar: MEA)

MEA è stato utilizzato per la conservazione dei ceppi fungini e per la determinazione della conta delle unità vitali. Composizione:

Maltosio 30,0 g; peptone di soia (peptocomplex) 3,0 g; Destrina 2,5 gr, glicerolo 1,0 g and agar 15,0 g in 1000 ml in acqua distillata esente da pirogeni. Sterilizzazione in autoclave.

Controllo del pH a $5,6 \pm 0,2$ a 20 ± 1 °C.

Malt extract agar (MEA) is used for counting of viable fungi and yeast strains, consisting of: Malt extract 30,0 g; Soya peptone (peptocomplex) 3,0 g; Dextrin 2,5 g; Glycerol 1,0 g and Agar 15,0 g in 1000 ml distilled water

Sterilize in the autoclave. pH control at $5,6 \pm 0,2$ at 20 ± 1 °C.

Diluente / Diluent

Soluzione di cloruro di sodio triptone costituita da:

NaCl 8,5 g; Triptone, digestione pancreatica di caseina 1,0 g in 1000 ml in acqua distillata esente da pirogeni.

Controllo del pH = $7,0 \pm 0,2$ a 20 °C. Sterilizzazione in autoclave.

Tryptone sodium chloride solution, consisting of:

Sodium chloride (NaCl) 8,5 g; Tryptone, pancreatic digest of casein 1,0 g g in 1000 ml

distilled water pyrogens free. pH control at $7,0 \pm 0,2$ at 20 ± 1 °C. Sterilize in the autoclave.

Neutralizzante / Neutralizer

Il neutralizzante è stato validato per il prodotto sottoposto a prova.

Composizione:

Lecitina 10 g/l

Polisorbato 80 50 g/l

Tiosolfato di sodio 10 g/l

Catalasi 0,25 g/l

Tampone fosfato 0,0025 ml/l/g

Acqua distillata a 1000 ml. Il pH a $7,0 \pm 0,2$ a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Sterilizzazione in autoclave

The neutralizer has been validated for the test product being tested.

Composition:

Lecithin , 10 g/l.

Polysorbate 80 50 g/l

Sodium thiosulphae, 10 g/l

Catalase 0,25g/l

Phosphate buffer 0.0025 ml / l

Distilled water to 1000 ml. pH control at $7,0 \pm 0,2$ AT $20^\circ \pm 1$ C. Sterilize in the autoclave.

Acqua dura per la diluizione del prodotto nella preparazione del campione /

Hard water for dilution of products

L'acqua dura utilizzata per la diluizione dei prodotti è stata preparata nel modo seguente:

- 600 ml di soluzione A [composizione: dissolvere 19,84 g di MgCl_2 anidro e 46,24 g di CaCl_2 anidro in 1000 ml di acqua distillata] e

- 700 ml di soluzione B [composizione: dissolvere 35,02 g di NaHCO_3 in 1000 ml di acqua distillata] miscelare e diluire fino a 1000 ml con acqua distillata.

Controllo del pH a $7,0 \pm 0,2$ a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Sterilizzazione per filtrazione con un filtro con pori di $0,45 \mu\text{m}$ di diametro.

For the preparation of 1 000 ml of hard water, the procedure is as follows:

-600 ml solution A [composition: dissolve 19,84 g magnesium chloride (MgCl_2) and 46,24 g calcium chloride (CaCl_2) in 1000 ml distilled water] and

-700 ml solution B [composition: dissolve 35,02 g sodium bicarbonate (NaHCO_3) in 1000 ml distilled water] mix and dilute to 1000 ml with distilled water.

pH control at $7,0 \pm 0,2$ at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Sterilize by membrane filtration with a membrane of $0,45 \mu\text{m}$ pore size diameter.

4.3 SOSTANZE INTERFERENTI / INTERFERING SUBSTANCES: *interfering proteins*

La sostanza interferente ha lo scopo di simulare la presenza di sostanza organica.

- **Condizioni di pulito:** 0,3 g/l di albumina bovina [0,03% BSA] (Sigma);

Albumina bovina frazione V 0,03 g SIGMA
 Acqua distillata fino a 100 ml
 Dissolvere 0,03 g di albumina bovina frazione V (idonea per metodi di microbiologia) in 97 ml di acqua distillata. Sterilizzazione per filtrazione su membrana.
 La concentrazione finale della albumina bovina è stata pari a 0,3 g / l.

- **Condizioni di sporco:** 3 g/l di albumina bovina (Sigma) [0,3% BSA]

a) BSA 3 gr/l
 Albumina bovina frazione V 0,3 g SIGMA
 Acqua distillata fino a 100 ml
 Dissolvere 0,3 g di albumina bovina frazione V (idonea per metodi di microbiologia) in 97 ml di acqua distillata. Sterilizzazione per filtrazione su membrana.

Il campione in esame non ha determinato la formazione di precipitati o fenomeni di flocculazione durante l'aggiunta di sostanze interferenti.

- *Clean conditions: bovine albumin solution (BSA) – low concentration: 0,03%:*

*BSA 0,03 g
 Distilled water to 100 ml
 Dissolve 0,03 g of bovine albumin fraction V (suitable for microbiological purposes) in 97 ml of water. Sterilization by membrane filtration.
 The final concentration of the bovine albumin was equal at 0,3 g/l.*

- *Dirty condition: BSA – high concentration 0,3%:*

*BSA 0,3 g
 Distilled water to 100 ml
 Dissolve 0,3 g of bovine albumin fraction V (suitable for microbiological purposes) in 97 ml of water. Sterilization by membrane filtration.
 The final concentration of bovine albumin was equal at 3 g/l.*

The product test solutions were prepared freshly and used in the test within 2 h. They were give a physically homogeneous preparation that is stable during the whole procedure and not formation of a precipitate or flocculent through the addition of the interfering substance.

4.4 APPARECCHIATURA E VETTERIA / APPARATUS AND GLASSWARE

- ✓ Autoclave a 121 °C per un tempo minimo di 15 min ad 1 atm /
Apparatus for sterilisation: an autoclave capable of being maintained at 121°C for a minimum holding time of 15 min.
- ✓ Bagnomaria termostato regolabile a diverse temperature tra 20°C ± 1 °C e 45°C ± 1 °C /
Water baths: capable of being controlled at 20°C ±1 °C and at 45°C ±1 °C
- ✓ Incubatore alla temperatura di 30 °C ± 1 °C.
Incubator: capable of being controlled either at 30 ±1 °C.
- ✓ pH-metro accuratezza di taratura di ± 0,1 unità di pH a 25 °C. /
pH-meter, having an accuracy of calibration of 0,1 pH units at 25°C.
- ✓ Cronometro / *Stopwatch.*
- ✓ Cappa a flusso laminare vertical Biohazard Classe II / *Biological safety cabinet with AirClean Systems Vertical Laminar Flow - "BioHazard" class II.*
- ✓ Agitatore Vortex® / *Electromechanical agitator: Vortex mixer.*
- ✓ Apparato di filtrazione con membrane filtranti aventi pori di diametro di 0,45 µm. /
Apparatus filtration with membrane filters of 0,45 µm pore size diameter
- ✓ Materiale monouso (provette; pipette in plastica graduate di capacità nominali 10 ml, 1 ml e 0,1 ml; Piatte Petri diametro 90 mm). /
Disposable material (tubes; graduated pipettes of nominal capacities 10 ml, 1 ml and 0,1 ml; Petri plates dishes of size 90 mm diameter).
- ✓ Microsfere di vetro (diametro: tra 3 mm e 4 mm) sterilizzate in autoclave /
Glass beads (Diameter: 3 mm to 4 mm) sterilized in an autoclave.

5 ESECUZIONE DEL SAGGIO / TEST METHOD

5.1 PROVE PRELIMINARE / PRELIMINARY TEST

5.1.1 PREPARAZIONE DELLE SOSPENSIONI FUNGINE (cellule vegetative per i lieviti e spore per la muffa *Aspergillus*) DI PROVA

I ceppi dei lieviti, *Candida albicans* ATCC sono stati sottoposti a 2 subcolture di seguito su slant di MEA e incubate a 30°C ±1°C per 48 h e 96 h per ottenere la sospensione di lievito di prova.

Il ceppo *Aspergillus niger* è stato coltivato su MEA in piastre Petri ed dopo incubazione a 30°C ± 1 °C per 72 h ÷ 120 h.

La procedura per preparare la sospensione test di *Aspergillus niger* è la seguente:

- a) sono state prelevate le conidiospore dalla superficie della coltura in MEA e sospesa in 10 ml di soluzione sterile di 0,05% p/V di polisorbato 80 in acqua con 5 g di microsferi di vetro. Dopo agitazione di 1 min la sospensione è stata filtrata con un filtro di vetro poroso sinterizzato
- b) è stato effettuato l'esame microscopico a 400 ingrandimenti, per evidenziare l'assenza di frammenti di micelio e di spore in germinazione.

Ogni sospensione di prova (lievito e muffa) è stata diluita con diluizioni seriali fino ad ottenere una concentrazione compresa tra $1,5 \times 10^7$ e $5,0 \times 10^7$ ufc (unità formanti colonia)/ml. Per il conteggio delle sospensioni fungine di prova sono state preparate delle diluizioni decimali seriali con il diluente da 10^{-5} fino a 10^{-6} . Dopo miscelazione è stato prelevato 1 ml, in doppio, da ogni diluizione ed è stato effettuato un conteggio per inclusione in 15 ml di MEA sciolto e raffreddato a 45 °C ± 1 °C.

Condizioni di incubazione: le piastre MEA sono state incubate a 30 °C ±1 °C:

- *Candida albicans*: per 48 h ÷ 96 h.
- *Aspergillus niger*: per 72 h ÷ 120 h.

Dopo incubazione è stato quindi determinato il numero (V_c = numero di colonie/piastra) di unità formanti colonia/ml per ciascuna piastra ed è stato poi calcolato il valore della sospensione di prova (**N**).

Working culture of test organisms

FUNGAL PREPARATION OF SUSPENSION (for *Candida albicans* vegetative cells and for *Aspergillus niger* spores) (“N”).

***Candida albicans* (yeast)**

In order to prepare the working culture of *Candida albicans*, prepared two subcultures from the stock culture by streaking onto MEA slopes and incubate at $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ for 48 h to 96 h.

***Aspergillus niger* (mold)**

For *Aspergillus niger*, use only the first subculture grown on MEA in Petri plates and incubate at $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ for 72 h ÷ 120 h.

The procedure for preparing the *Aspergillus niger* test suspension is as follows.

- a) Take the working culture and suspend the spores in 10 ml of sterile 0,05 % (w/v) polysorbate 80 solution in water. Using a glass rod or spatula, detach the conidiospores from the culture surface. Transfer the suspension into a flask and gently shake by hand for one minute together with 5 g of glass beads. Filter the suspension through a fritted filter.
- b) Carry out a microscopic examination under $\times 400$ magnification immediately after the preparation and just before the test, to show the absence of mycelia fragments and spore germination. The conidiospores are washed at least twice by resuspension in diluent and subsequent centrifugation.

Each test suspension (yeast and mold) was diluted with serial dilutions to adjust the number of cells in the suspension to $1,5 \times 10^7$ cfu/ml to $5,0 \times 10^7$ cfu/ml using diluent, estimating the number of cfu by any suitable means.

For counting, prepare 10^{-5} and 10^{-6} dilutions of the test suspension using diluent. Mix. Take a sample of 1,0 ml of each dilution in duplicate and inoculate using the pour plate technique, transfer each 1,0 ml sample into separate Petri dishes and add 15 ml melted MEA, cooled to $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Incubation: MEA plates were incubated at $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$:

- *Candida albicans*: ÷ 96 h to 48 h.
- *Aspergillus niger*: for 72 h to 120 h.

After incubation count the cfu on the plates to determine the total number of (V_c = number of colonies / plate) colony forming units (cfu) / ml for each plate.

Calculate the numbers of cfu/ml in the fungal (yeast and fungi) stock suspension N .

5.1.2 CONVALIDA DEL METODO DI DILUIZIONE-NEUTRALIZZAZIONE / DILUTION-NEUTRALIZATION METHOD VERIFICATION

La prova di convalida è stata effettuata contemporaneamente al procedimento di prova utilizzando solo la più alta concentrazione di prodotto e condizioni (sospensione fungina di prova, soluzione di prova del prodotto, neutralizzante o liquido di lavaggio, sostanze interferenti, acqua dura) identiche a quelle utilizzate nella prova.

The test and the control and validation procedures was carried out in parallel and separately for each experimental condition.

5.1.2.1 PREPARAZIONE DELLA SOSPENSIONE FUNGINA DI CONVALIDA (N_V)

Diluire ogni sospensione fungina di prova con il diluente in modo da ottenere tra 3×10^2 e $1,6 \times 10^3$ ufc/ml. Per il conteggio è stata preparata una diluizione 10^{-1} con il diluente e, dopo agitazione, è stato prelevato, in doppio, 1 ml e posto in piastre Petri per effettuare un conteggio per inclusione in MEA (separatamente per *Candida albicans* e per *Aspergillus niger*).

Dopo incubazione è stato, quindi, determinato il numero (V_c = numero di colonie/piastra) di unità formanti colonie/piastra per ogni diluizione, calcolando il valore in ufc/ml della sospensione fungina (N_V).

VALIDATION SUSPENSION (“ N_V ”)

To prepare the validation suspension, dilute each fungal test suspension with the diluents to obtain the fungal count of $3,0 \times 10^2$ cfu/ml to $1,6 \times 10^3$ cfu/ml.

*For counting, prepare a 10^{-1} dilution with diluent. Mix. Take a sample of 1,0 ml in duplicate and inoculate using the pour plate technique in MEA (separately for *Candida albicans* and for *Aspergillus niger*).*

After incubation count the cfu on the plates to determine the total number of cfu.

Calculate the numbers of cfu/ml in the validation suspension “ N_V ”.

5.1.2.2

CONVALIDA DELLE CONDIZIONI SPERIMENTALI SCELTE (VERIFICA DELL'ASSENZA DI EFFETTI LETALI O INIBITORI NELLE CONDIZIONI DI PROVA) (A)

In una provetta 1 ml della sostanza interferente è stato mescolato a 1 ml della sospensione di prova fungina contenente da 3×10^2 ucf/ml a $1,6 \times 10^3$ ucf/ml. Dopo 2 min. \pm 10 s a $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ sono stati aggiunti 8,0 ml di acqua dura. Dopo agitazione e, dopo il tempo di contatto e la temperatura previsti dal test (10 minuti a 20°C), è stato prelevato 1 ml, in doppio, e posto in piastre Petri in inclusione in MEA.

Dopo incubazione è stato, quindi, determinato il numero di colonie espresse in cfu/ml (A).

EXPERIMENTAL CONDITIONS CONTROL "A" – VALIDATION OF THE SELECTED EXPERIMENTAL CONDITIONS AND/OR VERIFICATION OF THE ABSENCE OF ANY LETHAL EFFECT IN THE TEST CONDITIONS

To validate the selected experimental conditions and/or verify the absence of any lethal effect in the test conditions, the procedure is as follows.

a) Pipette 1,0 ml of the interfering substance used in the test into a tube. Add 1,0 ml of the validation suspension. Start the stopwatch immediately, mix and place the tube at 20°C ± 1°C for 2 min ± 10 s.

At the end of this time, add 8,0 ml of hard water . Restart the stopwatch at the beginning of the addition. Mix and place the tube in a water bath controlled at 20°C ± 1°C for test contact time t (10 minutes). Just before the end of t, mix again.

b) At the end of t, take a sample of 1,0 ml of this mixture "A" in duplicate and inoculate using the pour plate technique . After incubation and counting calculate the numbers of cfu/ml in the validation suspension "A".

5.1.2.3 CONVALIDA DELLA NON TOSSICITÀ DEL NEUTRALIZZANTE (B) /

1,0 ml di acqua è stato addizionato a 8,0 ml di neutralizzante e aggiunto 1,0 ml di sospensione fungina da 3×10^2 ucf/ml a $1,6 \times 10^3$ ucf/ml. Dopo agitazione e dopo 5 min. ± 10 s di tempo di contatto a 20°C ± 1°C è stato prelevato 1 ml , in doppio, dalla miscela ottenuta e posto in piastre Petri in inclusione in MEA.

Dopo incubazione è stato quindi determinato il numero di colonie espresse in cfu/ml (B).

NEUTRALIZER CONTROL "B" – VERIFICATION OF THE ABSENCE OF TOXICITY OF THE NEUTRALIZER

To verify the absence of toxicity of the neutralizer, the procedure is as follows.

a) Pipette 8,0 ml of the neutralizer – used in the test — and 1,0 ml of water into a tube. Add 1,0 ml of the validation suspension . Start the stopwatch at the beginning of the addition, mix, and place the tube in a water bath controlled at 20 ± 1°C for 5 min ± 10 s. Just before the end of this time, mix .

c) At the end of this time, take a sample of 1,0 ml of this mixture "B" in duplicate and inoculate using the pour plate technique. After incubation and counting Calculate the numbers of cfu/ml in the validation suspension "B".

5.1.2.4 CONVALIDA DELLA NEUTRALIZZAZIONE (C)

1,0 ml di sostanza interferente è stato addizionato a 1,0 ml di acqua dura (utilizzata come diluente) e a 8,0 ml di soluzione test preparata del prodotto in esame. Dopo agitazione e, dopo il tempo di contatto e alla temperatura previsti dal test (15 minuti a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), è stato prelevato 1,0 ml della miscela e trasferito in una provetta contenente 8,0 di neutralizzante, previamente mantenuto a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. La miscela è stata lasciata a contatto 5 min. ± 10 s a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ed è stato aggiunto 1,0 ml di sospensione fungina contenente da 3×10^2 ucf/ml a $1,6 \times 10^3$ ufc/ml, agitato con il Vortex e dopo 30 min ± 1 min. di contatto a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Dopo agitazione è stato prelevato 1 ml, in doppio, dalla miscela ottenuta e posto in piastre Petri in inclusione in MEA.

Dopo incubazione è stato quindi determinato il numero di colonie espresse in cfu/ml (C).

METHOD VALIDATION "C" – DILUTION-NEUTRALIZATION VALIDATION

To validate the dilution neutralization method, the procedure is as follows.

a) Pipette 1,0 ml of the interfering substance used in the test into a tube. add 1,0 ml of the diluent and then, starting a stopwatch, add 8,0 ml of the product test solution only of the highest concentration used in the test. mix and place the tube in a water bath controlled at 20°C for t (test time contact: 15 minutes). just before the end of t, mix again.

b) At the end of t transfer 1,0 ml of the mixture into a tube containing 8,0 ml of neutralizer. restart the stopwatch immediately at the beginning of the addition. mix and place the tube in a water bath controlled at $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 5 min ± 10 s. add 1,0 ml of the validation suspension.

Start a stopwatch at the beginning of the addition and mix. place the tube at $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 30 min ± 1 min. just before the end of this time, mix again. at the end of this time, take a sample of 1,0 ml of the mixture "C" in duplicate and inoculate using the pour plate technique. After incubation and counting calculate the numbers of cfu/ml in the validation suspension "C".

5.2 ESECUZIONE DEL SAGGIO (Na) : METODO DILUIZIONE – NEUTRALIZZAZIONE

Per ogni ceppo fungino e per ogni concentrazione del campione in esame è stata allestita una provetta contenente 1 ml di sostanza interferente e 1 ml di *sospensione fungina di prova* avente una concentrazione tra $1,5 \times 10^7$ e $5,0 \times 10^7$ ufc/ml, alla temperatura prevista dal test di $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ per $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$. Dopo mescolamento sono stati aggiunti 8,0 ml di soluzione del prodotto in esame e dopo agitazione lasciati a contatto per il tempo di contatto stabilito di $10 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ e alla temperatura di esecuzione del test di $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Terminato il tempo di contatto, è stato prelevato, in doppio, 1 ml di miscela test e sono stati aggiunti 8,0 ml di neutralizzante e 1,0 ml di acqua. Dopo il tempo di neutralizzazione di $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$, 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 MEA. In parallelo lo stesso procedimento è stato ripetuto sostituendo la sostanza in esame con il diluente.

Condizioni di incubazione: le piastre MEA sono state incubate a $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$:

- *Candida albicans*: per $48 \text{ h} \div 72 \text{ h}$.

- *Aspergillus niger*: per $72 \text{ h} \div 120 \text{ h}$.

Dopo incubazione è stato quindi determinato il numero (Vc) di unità formanti colonie/piastra per ogni diluizione, calcolando il valore della miscela di prova (Na).

TEST "Na" – DETERMINATION OF FUNGICIDAL ACTIVITY DILUTION-NEUTRALIZATION METHOD

The procedure for determining fungicidal and yeasticidal concentrations is as follows.

a) Pipette 1,0 ml of the interfering substance into a tube. Add 1,0 ml of the test suspension. Start the stopwatch immediately, mix and place the tube at the chosen test temperature $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$.

At the end of this time, add 8,0 ml of one of the product test solutions. Restart the stopwatch at the beginning of the addition. Mix and place the tube at $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for the chosen contact time t (10 minutes at $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$). Just before the end of t , mix again.

b) At the end of t , take a 1,0 ml sample of the test mixture "Na" and transfer into a tube containing 8,0 ml neutralizer and 1,0 ml water. Mix and place in a water bath controlled at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. After a neutralization time of $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$, mix and immediately take a sample of 1,0 ml of the neutralized test mixture "Na" (containing neutralizer, product test solution, interfering substance and test suspension) in duplicate and inoculate using the pour plate technique.

1) Pour plate technique, pipette each 1,0 ml sample into separate Petri dishes and add 15 ml of melted MEA, cooled to $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$. Incubation and counting.

Calculate the numbers of cfu/ml in the fungal (yeast and fungi) test mixture "Na".

5.3 CALCOLO DEI RISULTATI / CALCULATION OF THE RESULTS

5.3.1 CALCOLO DELLE UNITÀ VITALI (UFC/ML) /

TOTAL VIABLE COUNT CALCULATION (CFU / ml) : Vc values: All experimental data are reported as Vc values: in the dilution-neutralization method (test and controls), a Vc value is the number of colony-forming units counted per 1,0 ml sample.

Il conteggio è stato effettuato usando il numero delle colonie contate su entrambe le piastre. Solo le piastre, contenenti da 15 a 300 colonie per i lieviti e da 15 a 150 per le muffe, sono state usate per il calcolo dei risultati. È accettata la deviazione standard del 10% pari rispettivamente al numero di colonie di 14 e 330 per i lieviti e 14 e 165 per le muffe. Nelle piastre dove il numero di colonie su tutte le piastre contate era maggiore di 330 (per i lieviti) e di 165 (per le muffe) è stato registrato il numero di ufc/ml come >330 (per i lieviti) e come >165 (per le muffe).

Count the plates and determine the number of cfu for each plate. Only the plates containing from 15 to 300 colonies (for yeast) and 15 to 150 (for molds) were used for the calculation of the results.

It is accepted standard deviation of 10% equal to the number of colonies of 14 and 330 (for yeast) and 14 and 165 (for molds). In the plates where the number of colonies counted on all plates was greater than 330 (for yeast) and 165 (for molds) was recorded the number of cfu / ml as > 330 (for yeasts) and as > 165 (for molds).

Sospensione micotica test N e N₀ / Calculation of N and N₀

Il calcolo della conta totale viene effettuato nel seguente modo:

Since two dilutions of the test suspension are evaluated, calculate the number of cfu/ml as the weighted mean count using the following equation:

$$N(\text{ufc} / \text{ml}) = \frac{c}{(n1 + 0,1n2)d}$$

Dove:

N = numero di cellule per ml in sospensione di prova

c = somma delle colonie contate su entrambe le piastre

n1 = numero delle piastre contate della più bassa diluizione (10⁻⁵)

n2 = numero delle piastre contate della più alta diluizione (10⁻⁶)

d = fattore di diluizione

where:

N is the number of cells per ml in the test suspension.

c is the sum of Vc values taken into account;

n1 is the number of Vc values taken into account in the lower dilution;

n2 is the number of Vc values taken into account in the higher dilution;

d is the dilution factor

Saggio vero e proprio N_a e saggio preliminare N_v / Calculation of N_a and N_v

Per il saggio vero e proprio (N_a) e per il saggio preliminare (N_v) il calcolo della conta totale viene effettuato nel seguente modo:

Calculate N_a using the following equation:

$$(N_a) \text{ ufc / ml} = \frac{10 c}{n}$$

Dove:

N_a = numero di sopravvissuti per ml nella miscela test alla fine del tempo di contatto e prima della neutralizzazione.

N_v = numero di cellule per ml nella sospensione convalida

c = somma delle colonie contate su entrambe le piastre

n = numero delle piastre contate

Where:

N_a is the number of survivors per ml in the test mixture at the end of the contact time and before neutralization.

N_v is the number of cells per ml in the validation suspension.

c is the sum of V_c values taken into account;

n is the number of V_c values taken into account.

Saggio preliminare A, B, C e N_{v0} / Calculation of A, B, C and N_{v0}

Per il saggio preliminare (A, B, C e N_{v0}) il calcolo della conta fungina viene effettuato nel seguente modo:

Calculate using the following equations:

$$A, B, C \text{ e } N_{v0} = c/n$$

Dove:

N_{v0} = numero di cellule per ml nelle miscele "A", "B" and "C" all'inizio del tempo di contatto (tempo 0).

c = somma delle colonie contate su entrambe le piastre

n = numero delle piastre contate

Where:

N_{v0} is the number of cells per ml in the mixtures "A", "B" and "C" at the beginning of the contact time (time 0).

c is the sum of V_c values taken into account;

n is the number of V_c values taken into account.

5.3.2 CALCOLO DELLA RIDUZIONE DELLA VITALITÀ / REDUCTION

Per ciascun microrganismo di prova e concentrazione di prova del prodotto è stato calcolato la riduzione delle cellule vive nel seguente modo:

$$R = \frac{N0}{Na}$$

Dove

R = riduzione della vitalità

$N0$ = conta fungina della sospensione di prova per ml all'inizio del tempo di contatto (tempo 0) ($N/10$).

Na = conta fungina della miscela test al termine del tempo di contatto

Were:

The reduction ($R = N0/Na$) is expressed in logarithm.

For each test organism record the number of cfu/ml in the test suspension N and the test Na . Calculate $N0$.

For each product concentration and each experimental condition, calculate and record the decimal log reduction (lg) separately using the equation:

$$lgR = lgN0 - lgNa$$

5.3.3 EFFICACIA FUNGICIDA / FUNGICIDAL ACTIVITY

Il prodotto di prova è considerato **FUNGICIDA** quando, per ogni ceppo fungino (lievito e muffe), a 20°C dopo il tempo di contatto preso in esame, provoca una riduzione della vitalità di almeno 10^4 , corrispondenti a una riduzione pari 4 logaritmi (99,99%) in base alle condizioni standard obbligatorie della norme UNI EN 1650:2008.

FUNGICIDAL ACTIVITY

According to UNI EN 1650:2008 standard under the obligatory test conditions the test product is considered FUNGICIDE when, for each fungal strain (yeasts and molds), at 20 ° C after the contact time taken into consideration, resulting at least a 4 lg reduction of vitality, corresponding to a reduction of 4 logarithms (99.99%).

5.4 VERIFICA DELLA METODOLOGIA DI CONVALIDA

Per ogni microrganismo di prova verificare che vengano rispettati i seguenti parametri di validazione:

Parametri di validazione:

- a) N compresa tra $1,5 \times 10^7$ cfu/ml e $5,0 \times 10^7$ cfu/ml ($7,17 \leq \lg N \leq 7,70$)
 N_0 compreso tra $1,5 \times 10^6$ e $5,0 \times 10^6$ ($6,17 \leq \lg N \leq 6,70$)
- b) N_{v0} compreso tra $3,0 \times 10^1$ e $1,6 \times 10^2$ ($1,47 \leq \lg N_{v0} \leq 2,20$)
 N_v compreso tra $3,0 \times 10^2$ e $1,6 \times 10^3$ ($2,47 \leq \lg N_v \leq 3,20$)
- c) A, B, C sia maggiore o uguale a 0.5 volte N_{v0}
- d) Valore medio delle conte di 2 successive diluizioni deve essere compreso tra 5 e 15.

Dove:

N: conteggio in ufc/ml della sospensione fungina;

N_v: conteggio in ufc/ml della sospensione fungina nel saggio preliminare;

A: conteggio in ufc/ml della soluzione di verifica delle condizioni sperimentali;

B: conteggio in ufc/ml per il controllo della tossicità del neutralizzante;

C: conteggio in ufc/ml dell'efficacia del neutralizzante.

VERIFICATION OF METHODOLOGY

For each test organism check that:

a) N is between $1,5 \times 10^7$ and $5,0 \times 10^7$ ($7,17 \leq \lg N \leq 7,70$)

N_0 is between $1,5 \times 10^6$ and $5,0 \times 10^6$ ($6,17 \leq \lg N_0 \leq 6,70$)

b) N_{v0} is between 30 and 160 ($3,0 \times 10^1$ and $1,6 \times 10^2$)

(N_v is between $3,0 \times 10^2$ and $1,6 \times 10^3$)

c) A, B, C are equal to or greater than $0,5 \cdot N_{v0}$.

d) control of weighted mean counts: quotient is not lower than 5 and not higher than 15.

Where:

N is the number of cfu/ml of the fungal test suspension;

N_v is the number of cfu/ml of the fungal suspension ;

A is the number of cfu/ml of the experimental conditions validation .

B is the number of cfu/ml of the neutralizer toxicity validation;

C is the number of cfu/ml of the dilution-neutralization validation;

6 RISULTATI DEL SAGGIO VERO E PROPRIO / TEST METHOD RESULTS

I valori di riduzione di vitalità (R) che dimostrano l'attività fungicida secondo il METODO DI PROVA QUANTITATIVO IN SOSPENSIONE UNI EN 1650:2008 (Fase 2 / Stadio 1) del prodotto in esame sono riportati nelle tabelle seguenti:

According to the test suspension EN 1650:2008 (Phase 2 / Step 1) the reduction of viability (R) of the test product shows fungicidal activity as shown in the following table:

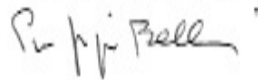
Prodotto test: KILL PLUS – NETTUNO S.r.l.	SOSPENSIONE MICETICA DI PROVA / <i>FUNGAL TEST SUSPENSION</i> (N ₀) Log ₁₀	RIDUZIONE MICETICA / FUNGAL REDUCTION					
		Sostanza interferente / <i>Interfering substances</i>					
<i>Microorganismi Test Test Organisms</i>		<i>CLEAN CONDITION:</i> Sostanza interferente / <i>Interfering substances</i> 0,3 gr/l BSA			<i>DIRTY CONDITION:</i> Sostanza interferente / <i>Interfering substances</i> 3 gr/l BSA		
		TEMPO DI CONTATTO 10 min					
		TEMPERATURA 20° C					
		20%	40%	80%	20%	40%	80%
		Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	6,30	<2,48	3,00	>4,16 Efficacy	<2,48	2,99	>4,05 Efficacy
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404.	6,19	<2,37	2,96	>4,06 Efficacy	<2,37	2,82	>4,00 Efficacy

7 CONCLUSIONI / CONCLUSIONS

Sulla base dei risultati ottenuti, rispettati i criteri di validità del saggio, la soluzione in esame **KILL PLUS – NETTUNO S.r.l.** è risultata **FUNGICIDA**, dopo il tempo di contatto di 10 minuti a 20°C, in condizioni di pulito (0,3 gr/l albumina bovina) ed in condizioni di sporco (3 gr/l albumina bovina), nei confronti di *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* ATCC 16404, secondo quanto previsto dalla norma UNI EN 1650:2008 – Fase 2 / Stadio 1.

*According to EN 1650:2008 (Phase 2 / Stage 1), the product **KILL PLUS – NETTUNO S.r.l.**, possesses **FUNGICIDAL ACTIVITY**, in 10 minutes at 20°C, under clean condition (0,3 gr/l bovine albumin) and under dirty condition (3 gr/l bovine albumin), for referenced strains *Candida albicans* ATCC 10231 and *Aspergillus niger* ATCC 16404.*

Data: 05/11/2015 / November 05th 2015



(Responsabile scientifico Firma / Signature
Prof. Pier Giorgio Balboni)
University Of Ferrara Dpt. Medicine
Prof. cultore della materia "Microbiologia"

APPENDICE 1: Risultati

RISULTATI TEST (PROVA EFFICACIA FUNGICIDA IN SOSPENSIONE)
Test results (fungicidal suspension test) EN 1650:2008 (Fase 2, stadio 1 / Phase 2, step1)

Nome Prodotto / Product-name: **KILL PLUS**

Produttore / Manufacturer:

NETTUNO SRL Via Industria, 16/18 - 24060 CASELLI CALEPIO (BG) - Italy

Concentrazione d'uso: pronto all'uso.

Condizioni di stoccaggio: Conservare in luogo fresco e asciutto / *Storage conditions: Store in a cool dry place.*Concentrazione test: 80%, 40%, 20% in acqua. *Test Concentration: 80%, 40%, 20% on water.*Nessun precipitato durante la procedura di analisi / *No precipitate during the test procedure (test mixture is homoneneous).*Metodo Neutralizzazione – Diluizione / Metodo in inclusione in piastra/ *Dilution neutralization method /**Inclusion on MEA on plate Petri method;* Numero di piastre / *Number of plates* 1 / ml (2 / diluizione / *dilution*)Neutralizzante / *Neutralizer:* . 30 g/l polysorbate 80; lecithin 3 g/ ; saponin 30 g/l; L-histidine 1 g/l in diluent.

Test temperature: 20°C.

Test organism: *Candida albicans* ATCC 10231.

Incubation temperature: 30°C

Data fine analisi: 20/10/2015.

End date test: 2015-10-20.

<i>Candida albicans</i> ATCC 10231			CLEAN CONDITION Interfering substances: BSA 0,3 g/l bovine serum albumin								
Validation suspension (Nv_o)			Experimental Conditions control (A)			Neutralizer control (B)			Method validation (C)		
V_{C1}	148 (73 + 76)	$X = 154$	V_{C1}	122 (64 + 58)	$X = 126$	V_{C1}	132 (67 + 65)	$X = 128$	V_{C1}	90 (46 + 44)	$X = 94$
V_{C2}	160 (85 + 75)		V_{C2}	130 (68 + 62)		V_{C2}	124 (62 + 64)		V_{C2}	98 (43 + 47)	
$30 \leq X \text{ of } Nv_o \leq 160$ The test is VALID			$x \text{ of } A \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID			$x \text{ of } B \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID			$x \text{ of } C \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID		

Test suspension	Test Suspension (N):	N	V_{C1}	V_{C2}	$X \text{ wm} = 202 \times 10^5$; $\lg N = 7,30$ $N_0 = N/10$; $\lg N = 6,30$ $6,17 \leq \lg N \leq 6,70 \Rightarrow$ The test is VALID <i>*used for calculation</i>
		10^{-5}	205*	200*	
		10^{-6}	45	40	

Results <i>Na</i>	Conc. of the product %	V_{C1}	V_{C2}	$\text{Lg } Na = X \times 10$	$\text{Lg } Na$	$\text{lg } R$ ($\text{lg } N_0 = 6,30$)	Contact Time (min)
	20%	>660	>660	>6600	>3,82	<2,48	10 min
	40%	150	170	1600	3,30	3,00	10 min
	80%	12	14	<140	2,14	4,16	10 min

Legenda / *Explanation:* V_C = count per ml (one plate duplicate) X = average of V_{C1} and V_{C2} (1 + 2 duplicate) $X \text{ wm}$ = weighted mean of X R = reduction ($\text{lg } R = \text{lg } N_0 - \text{lg } Na$)

<i>Candida albicans</i> ATCC 10231			<i>DIRTY CONDITION: Interfering substances: BSA 3 g/l bovine serum albumin</i>								
Validation suspension (Nv_o)			Experimental Conditions control (A)			Neutralizer control (B)			Method validation (C)		
V_{C1}	148 (73+76)	$X = 154$	V_{C1}	123 (50+73)	$X = 119$	V_{C1}	132 (67+65)	$X = 128$	V_{C1}	79 (37+42)	$X = 87$
V_{C2}	160 (85+75)		V_{C2}	115 (56+59)		V_{C2}	124 (62+64)		V_{C2}	95 (43+52)	
$30 \leq X \text{ of } Nv_o \leq 160$ The test is VALID			$x \text{ of } A \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID			$x \text{ of } B \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID			$x \text{ of } C \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID		

Test suspension	Test Suspension (N):	N	V_{C1}	V_{C2}	$X_{wm} = 202 \times 10^5$; $\lg N = 7,30$ $N_0 = N/10$; $\lg N = 6,30$ $6,17 \leq \lg N \leq 6,70 \Rightarrow$ The test is VALID <i>*used for calculation</i>
		10^{-5}	205*	200*	
		10^{-6}	45	40	

Results <i>Na</i>	Conc. of the product %	V_{C1}	V_{C2}	$Lg Na = X \times 10$	$Lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 6,30$)	Contact Time (min)
	20%	>660	>660	>6600	>3,82	<2,48	10 min
	40%	200	210	2050	3,31	2,99	10 min
	80%	20	16	180	2,25	4,05	10 min

Legenda / Explanation: V_C = count per ml (one plate duplicate) X = average of V_{C1} and V_{C2} (1 + 2 duplicate) X_{wm} = weighted mean of X R = reduction ($\lg R = \lg N_0 - \lg Na$)

RISULTATI TEST (PROVA EFFICACIA FUNGICIDA IN SOSPENSIONE)
Test results (fungicidal suspension test)

Nome Prodotto / Product-name: **KILL PLUS**

Produttore / Manufacturer:

NETTUNO SRL Via Industria, 16/18 - 24060 CASELLI CALEPIO (BG) - Italy

Concentrazione d'uso: pronto all'uso.

Condizioni di stoccaggio: Conservare in luogo fresco e asciutto / *Storage conditions: Store in a cool dry place.*

Concentrazione test: 80%, 40%, 20% in acqua. *Test Concentration: 80%, 40%, 20% on water.*

Nessun precipitato durante la procedura di analisi / *No precipitate during the test procedure (test mixture is homoneneous).*

Metodo Neutralizzazione – Diluizione / Metodo in inclusione in piastra/ *Diluition neutralization method /*

Inclusion on MEA on plate Petri method; Numero di piastre / *Number of plates* 1 / ml (2 / diluizione / *diluition*)

Neutralizzante / *Neutralizer:* . 30 g/l polysorbate 80; lecithin 3 g/ ; saponin 30 g/l; L-histidine 1 g/l in diluent.

Test temperature: 20°C.

Test organism: *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Incubation temperature: 30°C

Data fine analisi: 20/10/2015.

End date test: 2015-10-20.

<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404			CLEAN CONDITION Interfering substances: BSA 0,3 g/l bovine serum albumin								
Validation suspension (Nv_o)			Experimental Conditions control (A)			Neutralizer control (B)			Method validation (C)		
V_{C1}	115 (62 + 53)	$X = 113$	V_{C1}	78 (45 + 33)	$X = 89$	V_{C1}	90 (47 + 43)	$X = 97$	V_{C1}	76 (36 + 40)	$X = 78$
V_{C2}	111 (64 + 47)		V_{C2}	100 (54 + 46)		V_{C2}	104 (56 + 48)		V_{C2}	80 (41 + 39)	
$30 \leq X \text{ of } Nv_o \leq 160$ The test is VALID			$x \text{ of } A \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID			$x \text{ of } B \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID			$x \text{ of } C \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_o$ The test is VALID		

Test suspension	Test Suspension (N):	N	V_{C1}	V_{C2}	$X \text{ wm} = 155 \times 10^5$; $\lg N = 7,19$ $N_0 = N/10$; $\lg N = 6,19$ $6,17 \leq \lg N \leq 6,70 \Rightarrow$ The test is VALID <i>*used for calculation</i>
		10^{-5}	150*	160*	
		10^{-6}	40	35	

Results <i>Na</i>	Conc. of the product %	V_{C1}	V_{C2}	$\text{Lg } Na = X \times 10$	$\text{Lg } Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 6,19$)	Contact Time (min)
	20%	>660	>660	>6600	>3,82	<2,37	10 min
	40%	195	150	1725	3,23	2,96	10 min
	80%	14	13	135	2,13	4,06	10 min

Legenda / *Explanation:*

V_C = count per ml (one plate duplicate)

X = average of V_{C1} and V_{C2} (1 + 2 duplicate)

$X \text{ wm}$ = weighted mean of X

R = reduction ($\lg R = \lg N_0 - \lg Na$)

<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404			DIRTY CONDITION: Interfering substances: BSA 3 g/l bovine serum albumin								
Validation suspension (Nv_0)			Experimental Conditions control (A)			Neutralizer control (B)			Method validation (C)		
V_{C1}	115 (62+53)	$X = 113$	V_{C1}	75 (35+40)	$X = 87$	V_{C1}	90 (47+43)	$X = 97$	V_{C1}	72 (39+33)	$X = 75$
V_{C2}	111 (64+47)		V_{C2}	99 (53+46)		V_{C2}	104 (56+48)		V_{C2}	78 (37+39)	
$30 \leq X \text{ of } Nv_0 \leq 160$ The test is VALID			$x \text{ of } A \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_0$ The test is VALID			$x \text{ of } B \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_0$ The test is VALID			$x \text{ of } C \text{ is } \geq 0,5x X \text{ of } Nv_0$ The test is VALID		

Test suspension	Test Suspension (N):	N	V_{C1}	V_{C2}	$X \text{ wm} = 155 \times 10^5$; $\lg N = 7,19$ $N_0 = N/10$; $\lg N = 6,19$ $6,17 \leq \lg N \leq 6,70 \Rightarrow$ The test is VALID <i>*used for calculation</i>
		10^{-5}	150*	160*	
		10^{-6}	40	35	

Results N_a	Conc. of the product %	V_{C1}	V_{C2}	$\text{Lg } N_a = X \times 10$	$\text{Lg } N_a$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 6,19$)	Contact Time (min)
	20%	>660	>660	>6600	>3,82	<2,37	10 min
	40%	220	250	2350	3,37	2,82	10 min
	80%	16	15	155	2,19	4,00	10 min

Legenda / Explanation:

V_C = count per ml (one plate duplicate)

X = average of V_{C1} and V_{C2} (1 + 2 duplicate)

$X \text{ wm}$ = weighted mean of X

R = reduction ($\lg R = \lg N_0 - \lg N_a$)