

DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%

MICROBIOLOGICAL DATA *MICROBIOLÓGIA*

Ready to use product.

Hygienic washing in 30 sec, 20°C:

Bactericide: EN 13727, EN 1499 - 3 ml

Yeasticide: EN 13624

Surgical cleaning in 5 min, 20°C:

Bactericide: EN 13727, EN 12791 - 6 ml

Yeasticide: EN 13624

Active according to EN 14476 in 30 sec against HIV-1, PRV (surrogate of HBV), BVDV (surrogate of HCV), Herpesvirus, Rotavirus and RSV.

Producto listo para usar.

Lavado higiénico en 30 seg, 20°C:

Bactericida: EN 13727, EN 1499 - 3 ml

Levuricida: EN 13624

Lavado quirúrgico en 5 min, 20°C:

Bactericida: EN 13727, EN 12791 - 6 ml

Levuricida: EN 13624

Activo según EN 14476 en 30 seg frente a HIV-1, PRV (virus modelo HBV), BVDV (virus modelo HCV), Herpesvirus, Rotavirus y VRS.

DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%

MICROBIOLOGICAL DATA *MICROBIOLÓGIA*

| Study number <i>Número de estudio</i> | Microbiological activity <i>Actividad microbiológica</i> | Results <i>Resultados</i> |
|---|---|---|
| | | Contact time <i>Tiempo de contacto</i> |
| BACTERICIDAL ACTIVITY <i>Actividad bactericida</i> | | |
| <u>Hygienic washing</u> <i>Lavado higiénico</i> | | |
| 34172 | EN 13727 | 30 sec |
| 34155 | EN 1499 – 3 ml | 30 sec |
| <u>Surgical cleaning</u> <i>Lavado quirúrgico</i> | | |
| 34173 | EN 13727 | 1 min |
| 27873 | EN 12791 – 6 ml | 5 min |
| YEASTICIDAL ACTIVITY <i>Actividad levaduricida</i> | | |
| <u>Hygienic washing</u> <i>Lavado higiénico</i> | | |
| 34980 | EN 13624 | 30 sec |
| <u>Surgical cleaning</u> <i>Lavado quirúrgico</i> | | |
| 34171 | EN 13624 | 2 min |
| VIRUCIDAL ACTIVITY <i>Actividad virucida</i> | | |
| 31282 | EN 14476 HIV-1 | 30 sec |
| 27424 | EN 14476 PRV (surrogate of HBV) | 30 sec |
| 27425 | EN 14476 BVDV (surrogate of HCV) | 30 sec |
| 27426 | EN 14476 Herpesvirus | 30 sec |
| 27565 | EN 14476 Rotavirus | 30 sec |
| 28002 | EN 14476 RSV | 30 sec |

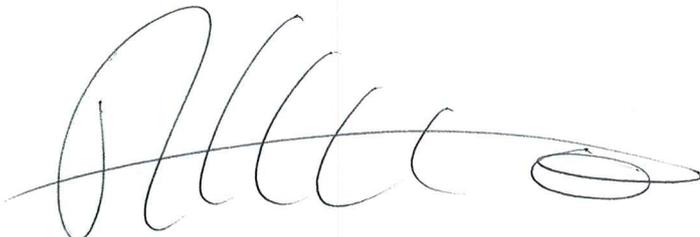
ATTESTATION / ATESTACIÓN

Nous, soussignés Laboratoires ANIOS, attestons que la composition de la FORMULE 2173 correspond qualitativement et quantitativement au produit DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%. Par conséquent, les conclusions de l'ensemble des documents relatifs à la FORMULE 2173 (Etudes microbiologiques et physico-chimiques) sont applicables au produit DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%.

We, undersigned Laboratoires ANIOS, attest that the composition of the FORMULA 2173 corresponds qualitatively and quantitatively with the product DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%. Consequently, the conclusions of the associated documents to the FORMULA 2173 (Microbiological and physico-chemical studies) are applicable to the product DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%.

Suscribimos, Laboratoires ANIOS, certificamos que la composición de la FORMULA 2173 corresponde cualitativamente y cuantitativamente al producto DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%. En consecuencia, las conclusiones de los documentos asociados a la FORMULA 2173 (Estudios microbiológicos y físico-químicos) se aplican al producto DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%.

Fait à Lille-Hellemmes, le 26 août 2016
Done in Lille Hellemmes, the 26th of August 2016
Efectuado en Lille Hellemmes, el 26 de agosto de 2016



Dr Gaétan Rauwel
Directeur Recherche et Développement
Research and Development Director
Director de investigación y desarrollo

Sainghin en Mélantois, le 27 juin 2016
Sainghin en Mélantois, on the June 27th 2016

Rapport d'essai : N° A 16 91 13727
Test report : N° A 16 91 13727

1. **Objet de la demande (Study Number) n° 34172**

Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de la formule **2173**. Méthode d'essai et prescriptions (phase 2 - étape 1) NF EN 13727 + A2 (Décembre 2015). Application aux désinfectants chimiques pour le lavage hygiénique des mains.

Indice de classement T 72-175.
Méthode par dilution neutralisation.

*Chemical antiseptics and disinfectants. Quantitative suspension test for the evaluation of the bactericidal activity of the formula **2173**. Test method and prescriptions (phase 2 - step 1) according to NF EN 13727 + A2 (December 2015). Application to chemical disinfectants for the hygienic handwash. Classification index T 72-175.*

Method by dilution neutralisation.

Ce rapport d'essai ne concerne que le produit (cité ci après) soumis à l'essai.
This trial report concerns only the product (quoted this later) subjected on approval

Ce document comporte 11 pages numérotées dont 1 annexe de 4 pages
This report is made of 11 numbered pages including 1 annex of 4 pages

La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous la forme de fac- similé photographique intégral. Seule la version électronique fait foi.
The reproduction of this trial report is authorized only under the shape of complete photographic reproduction Only the electronic version is valid.

2. Sommaire (Summary)

| | |
|---|---|
| 1. Objet de la demande (<i>Study Number</i>) n° 34172 | 1 |
| 2. Sommaire (<i>Summary</i>) | 2 |
| 3. Introduction (<i>Introduction</i>) | 3 |
| 4. Identification de l'échantillon (<i>Sample Identification</i>) | 3 |
| 5. Méthode expérimentale (<i>Experimental Method</i>) | 4 |
| 5.1. Conditions expérimentales (<i>Experimental conditions</i>) | 4 |
| 5.2. Méthode par dilution neutralisation (<i>Method by dilution neutralisation</i>) | 4 |
| 6. Résultats (<i>Results</i>) | 5 |
| 6.1. Essais de validation des conditions expérimentales (<i>Validation tests</i>) | 5 |
| 6.2. Essais d'activité bactéricide (<i>Evaluation of bactericidal activity</i>) | 6 |
| 7. Conclusion (Conclusion) | 6 |
| 8. Annexe - Données expérimentales (Experimental Data) | 7 |

3. Introduction (*Introduction*)

L'essai a été réalisé selon la méthode d'essai décrite dans la norme européenne EN 13727 + A2 « Désinfectants chimiques et antiseptiques- Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide en médecine (phase 2 /Etape 1) » .

Détermination de l'activité bactéricide dans les conditions de laboratoire définies par la présente norme européenne .

The test was realised according to the test method described in the European standard EN 13727 + A2 « Chemical disinfectants and antiseptics- Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area».

Determination of the bactericidal activity in the laboratory conditions defined in the present European standard .

4. Identification de l'échantillon (*Sample Identification*)

| | |
|---|--|
| Code formule | 2173 |
| <i>Code formula</i> | |
| Numéro d'identification de l'échantillon | 3335 16 05 13727 |
| <i>Identification of the sample</i> | |
| Numéro de lot | U132.04 |
| <i>Batch number</i> | |
| Fabricant | Laboratoires ANIOS |
| <i>Manufacturer</i> | |
| Date de réception au laboratoire | Le 25/05/16 |
| <i>Receipt date at the laboratory</i> | <i>On the 25/05/16</i> |
| Conditions de stockage au laboratoire | T° ambiante et obscurité |
| <i>Storage conditions at the laboratory</i> | <i>Room temperature and darkness</i> |
| Substances actives | Digluconate de Chlorhexidine (CAS : 18472-51-0) : 40mg/g |
| <i>Activ substances</i> | <i>Chlorhexidine digluconate (CAS : 18472-51-0) : 40mg/g</i> |
| Période d'essai | Du 31/05/16 au 17/06/16 |
| <i>Period of analysis</i> | <i>From 31/05/16 to 17/06/16</i> |

5. Méthode expérimentale (Experimental Method)

5.1. Conditions expérimentales (Experimental conditions)

| | |
|---|--|
| Température de l'essai | 20°C ± 1°C |
| <i>Test temperature</i> | |
| Temps de contact | 30 secondes ± 5s |
| <i>Contact Time</i> | |
| Diluant de la formule lors des essais | Eau dure |
| <i>Diluent of the formula used during the test</i> | <i>Hard water</i> |
| Apparence de la formule et de ses dilutions | Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai |
| <i>Appearance formula dilutions</i> | <i>Preparation physically homogeneous and stable during test</i> |
| Souches testées | <ul style="list-style-type: none">○ Escherichia coli K12 54117○ Pseudomonas aeruginosa CIP 103467○ Staphylococcus aureus CIP 483○ Enterococcus hirae CIP 5855 |
| <i>Tested strains</i> | |
| Substance interférente | Albumine bovine à 3g/l + 3ml/l érythrocytes |
| <i>Interfering substance</i> | <i>3 g/l BSA + 3ml/l erythrocytes</i> |
| Stabilité du mélange formule et substances interférentes | Absence de précipité pendant l'essai |
| <i>Stability of the mixture (formula and interfering substance)</i> | <i>Precipitate absent throughout the test</i> |
| Température d'incubation | 37°C ± 1°C |
| <i>Incubation temperature</i> | <i>37°C ± 1°C</i> |

5.2. Méthode par dilution neutralisation (Method by dilution neutralisation)

| | |
|---|---|
| Nature du neutralisant utilisé | <ul style="list-style-type: none">○ Formule : F010 |
| <i>Nature of the neutralizer agent used</i> | <ul style="list-style-type: none">○ <i>Formula : F010</i> |
| Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement | ∅ |
| <i>Neutralizer agent added to the counting medium</i> | <i>∅</i> |

6. Résultats (Results)

6.1. Essais de validation des conditions expérimentales (Validation tests)

Vérification de la méthodologie et validation de la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **50%** de la formule **2173** soumise à l'essai.

Checking of the method and validation of the method by dilution neutralisation for the **50%** test concentration of the formula **2173** to be tested.

| | Nombre de cellules viables (UFC/ml) (Number of viable cells(CFU/ml)) | | | | | | | |
|-------------------------------|--|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--|
| Souches testées | Suspension d'essai | Suspension d'essai / 10 | Suspension de validation | Suspension de validation / 10 | Suspension de validation B | Validation conditions expérimentales | Non toxicité du neutralisant | Inactivation par dilution neutralisation |
| Tested strains | Test suspension | Test suspension / 10 | Validation suspension | Validation suspension / 10 | B Validation suspension | Experimental conditions control | Neutralizer toxicity control | Dilution neutralization control |
| | N | N ₀ | N _v | N _{v0} | N _{vB} | A | B | C |
| Escherichia coli K12 | 1,6.10 ⁸ | 1,6.10 ⁷ | 4,5.10 ² | 4,5.10 ¹ | 4,4.10 ⁴ | 4,2.10 ¹ | 4,1.10 ¹ | 3,7.10 ¹ |
| Pseudomonas aeruginosa | 2,1.10 ⁸ | 2,1.10 ⁷ | 5,6.10 ² | 5,6.10 ¹ | 5,9.10 ⁴ | 5,8.10 ¹ | 5,9.10 ¹ | 5,8.10 ¹ |
| Staphylococcus aureus | 1,7.10 ⁸ | 1,7.10 ⁷ | 4,7.10 ² | 4,7.10 ¹ | 4,4.10 ⁴ | 4,6.10 ¹ | 5,5.10 ¹ | 4,8.10 ¹ |
| Enterococcus hirae | 1,7.10 ⁸ | 1,7.10 ⁷ | 3,7.10 ² | 3,7.10 ¹ | 4,1.10 ⁴ | 3,6.10 ¹ | 4,6.10 ¹ | 4,8.10 ¹ |

Pour les souches soumises à l'essai - For the tested strains.

N est compris entre $1,5 \times 10^8$ UFC/ml et 5×10^8 UFC/ml
is comprised between 1.5×10^8 CFU/ml and 5×10^8 CFU/ml

N₀ est compris entre $1,5 \times 10^7$ UFC/ml et 5×10^7 UFC/ml
is comprised between 1.5×10^7 CFU/ml and 5×10^7 CFU/ml

N_v est compris entre 3×10^2 UFC/ml et 1.6×10^3 UFC/ml
is comprised between 3×10^2 CFU/ml and 1.6×10^3 CFU/ml

N_{v0} est compris entre 3×10^1 UFC/ml et 1.6×10^2 UFC/ml
is comprised between 3×10^1 CFU/ml and 1.6×10^2 CFU/ml

N_{vB} est compris entre 3×10^4 UFC/ml et 1.6×10^5 UFC/ml
is comprised between 3×10^4 CFU/ml and 1.6×10^5 CFU/ml

B est supérieur ou égal à $0,0005 \times N_{vB}$
are higher or equal to $0,0005 \times N_{vB}$

A,C sont supérieurs ou égaux à $0,5 \times N_{v0}$
are higher or equal to $0.5 \times N_{v0}$

La neutralisation est validée avec la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **50%** de la formule **2173** et pour les souches soumises à l'essai.

The neutralization is validated with the method by dilution neutralisation for the **50%** test concentration of the formula **2173** and for the tested strains.

6.2. Essais d'activité bactéricide (*Evaluation of bactericidal activity*)

| Souches testées | Nombre de cellules viables (UFC/ml) pour le mélange d'essai (Na) pour les concentrations de : %(v/v) | | |
|-------------------------------|--|----------------------|----------------------|
| Tested strains | Number of the viable cells (CFU/ml) for the test mixture (Na) for the concentrations of : %(v/v) | | |
| | 5 | 25 | 50 |
| Escherichia coli K12 | 2,0.10 ⁴ | <1,4.10 ² | <1,4.10 ² |
| Pseudomonas aeruginosa | 2,3.10 ⁴ | <1,4.10 ² | <1,4.10 ² |
| Staphylococcus aureus | 2,3.10 ⁴ | 6,5.10 ² | <1,4.10 ² |
| Enterococcus hirae | 3,3.10 ⁴ | 1,8.10 ³ | 1,0.10 ³ |

| Souches testées | Réduction du nombre de cellule viables à la concentration d'essai. R = Log N0 - Log Na | | |
|-------------------------------|---|-----------------|-----------------|
| Tested strains | Reduction of the number of viable cells at the test concentration. R = Log N0 - Log Na | | |
| | 5 | 25 | 50 |
| Escherichia coli K12 | 2,9 | <u>≥ 5,1</u> | <u>≥ 5,1</u> |
| Pseudomonas aeruginosa | 2,9 | <u>> 5,2</u> | <u>> 5,2</u> |
| Staphylococcus aureus | 2,8 | <u>4,4</u> | <u>≥ 5,1</u> |
| Enterococcus hirae | 2,7 | <u>3,9</u> | <u>4,2</u> |

7. Conclusion (Conclusion)

Selon la norme NF EN 13727 + A2 (Décembre 2015), la formule **2173**, lorsqu'elle est diluée à la concentration de 25,00% (v/v) dans de l'eau dure, présente une activité bactéricide en **30 secondes** de contact à 20°C en conditions de saleté, vis-à-vis des souches de référence pour le lavage hygiénique des mains : **Escherichia coli K12, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Enterococcus hirae**.

According to the European standard NF EN 13727 + A2 (December 2015), the formula **2173**, when diluted at the concentration of 25.00% (v/v) in hard water, presents a bactericidal activity in a 30 seconde contact time at 20°C in dirty conditions against the referenced strains for the hygienic handwash: **Escherichia coli K12, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Enterococcus hirae**.

8. Annexe - Données expérimentales (Experimental Data)

Escherichia coli K12 - 30 secondes

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

Numéro d'identification: 3335 16 05 13727 Date : 15.06.16
 Type de produit testé : Lavage des mains
 Méthode utilisée : Classique
 Température : Inférieure à 40°C
 Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boîte | | | |
|----------------------------|---------------------------------------|------------------------|-------------|-------------|
| | Dilution -6 | Dilution -7 | Dilution -6 | Dilution -7 |
| Escherichia coli K12.54117 | 154 | 17 | 154 | 17 |
| | 162 | 15 | 162 | 15 |
| Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | |

Numéro d'identification: 3335 16 05 13727

| | | | | | | | | |
|-----|---|------------|---|---------|--|-------------------|---------|--------|
| Nv | C | 890 2 | = | 4,5E+02 | | N _{v0} = | 4,5E+01 | UFC/mL |
| NvB | C | 88000 2 | = | 4,4E+04 | | | | UFC/mL |
| A | C | 84 2 | = | 4,2E+01 | | | | UFC/mL |
| B | C | 82 2 | = | 4,1E+01 | | | | UFC/mL |
| C | C | 74 2 | = | 3,7E+01 | | | | UFC/mL |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 348
 n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution 2
 n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution 2
 d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte : 10⁶
Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{348}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^6} = 1,6E+08$ UFC/ml N₀=N/10⁶ = 1,6E+07

Interprétation :
 N est compris entre 1,5.10⁸ UFC/ml et 5.10⁸ UFC/ml 1,6E+08 Oui
 Nv est compris entre 3.10² et 1,6.10³ 4,5E+02 Oui
 NvB est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 4,4E+04 Oui
 Nv0 est compris entre 3.10¹ et 1,6.10² 4,5E+01 Oui
 A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 4,2E+01 et 3,7E+01 Oui
 B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB 4,1E+01 Oui
La neutralisation est validée : Oui

$$5 < Q = \frac{\text{dil} - 6 / 2}{\text{dil} - 7 / 2} < 15 = \frac{158}{16} = 9,9$$

Essai de validation : Temps de contact : VL 30" **Essai :** Temps de contact : VL 30"

| | De 14 à 330 UFC par boîte | | De 14 à 330 UFC par boîte | | Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 10 ml de la fiole à 50% | | 50 ml de la fiole à 50% | | 62,5 | | |
|--|---------------------------|------------------------|---------------------------|----|---|--|-------------------------|-----|-------------------------|---|------|---|---|
| | | | | | Concentration produit % | | 5 | | 25 | | 50 | | |
| Nv : témoin suspension | 47 | 47 | 47 | 47 | Dénombrement à 20h/24h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 42 | 42 | 42 | 42 | | -1 | 216 | 193 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| NvB : témoin suspension B | 43 | 43 | 43 | 43 | | -2 | 15 | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 45 | 45 | 45 | 45 | | Dénombrement à 40h/48h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A : témoin des conditions expérimentales | 38 | 38 | 38 | 38 | | | -1 | 216 | 193 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 46 | 46 | 46 | 46 | | | -2 | 15 | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B : témoin de non-toxicité du neutralisant | 38 | 38 | 38 | 38 | $Na = \frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$ 2,0E+04 < 1,4E+02 < 1,4E+02 Log N ₀ = 7,2 Log Na = 4,3 2,1 2,1 Calcul de réduction = Log N ₀ - Log Na = Log R 2,9 > 5,1 > 5,1 | | | | | | | | |
| | 44 | 44 | 44 | 44 | | | | | | | | | |
| C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 50 % | 41 | 41 | 41 | 41 | | | | | | | | | |
| | 33 | 33 | 33 | 33 | | | | | | | | | |
| Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | | | | | | | | | | |

Calculs Nv = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml) N_{v0}, A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml).

NvB = $\frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml).

C : somme des valeurs Vc prises en compte n : nombre de boîtes considérées

SUITE A DONNER :
 VISA : Conforme

Pseudomonas aeruginosa - 30 secondes

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

Numéro d'identification: **3335 16 05 13727** Date: **31.05.16**
Type de produit testé : Lavage des mains
Méthode utilisée : Classique
Température : Inférieure à 40°C
Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boîte | | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|-------------|-------------|
| | Dilution -6 | Dilution -7 | Dilution -6 | Dilution -7 |
| Pseudomonas aeruginosa CIP 103467 | 202 | 20 | 202 | 20 |
| | 214 | 23 | 214 | 23 |
| Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | |

Numéro d'identification: **3335 16 05 13727**

| | | | | | | | |
|-----|---|--------------------|---|---------|------------------|---------|--------|
| Nv | C | $\frac{1120}{2}$ | = | 5,6E+02 | N ₀ = | 5,6E+01 | UFC/mL |
| NvB | C | $\frac{117000}{2}$ | = | 5,9E+04 | | | UFC/mL |
| A | C | $\frac{116}{2}$ | = | 5,8E+01 | | | UFC/mL |
| B | C | $\frac{117}{2}$ | = | 5,9E+01 | | | UFC/mL |
| C | C | $\frac{116}{2}$ | = | 5,8E+01 | | | UFC/mL |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 459
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution 2
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution 2
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte :10⁶
Moyenne pondérée: $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{459}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^6} = 2,1E+08$ UFC/ml N₀=N¹⁰= 2,1E+07

Interprétation :
N est compris entre 1,5.10⁸ UFC/ml et 5.10⁸ UFC/ml 2,1E+08 Oui
Nv est compris entre 3.10² et 1,6.10³ 5,6E+02 Oui
NvB est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 5,9E+04 Oui
Nv0 est compris entre 3.10¹ et 1,6.10² 5,6E+01 Oui
A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 5,8E+01 et 5,8E+01 Oui
B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB 5,9E+01 Oui
La neutralisation est validée : Oui

$$5 < Q = \frac{\text{dil} - 6 / 2}{\text{dil} - 7 / 2} < 15 = \frac{208}{21,5} = 9,7$$

Essai de validation : Temps de contact : **VL 30"** Essai : Temps de contact : **VL 30"**

| | De 14 à 330 UFC par boîte | | De 14 à 330 UFC par boîte | | Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 10 ml de la fiole à 50% | | 50 ml de la fiole à 50% | | 62,5 | | |
|--|---------------------------|------------------------|---------------------------|---|---|----------|-------------------------|---------|-------------------------|---------|------|--|--|
| | 55 | | 55 | | Concentration produit % | | 5 | | 25 | | 50 | | |
| Nv : témoin suspension | 57 | 57 | | | | | | | | | | | |
| NvB : témoin suspension B | 59 | 59 | | | | | | | | | | | |
| | 58 | 58 | | | | | | | | | | | |
| A : témoin des conditions expérimentales | 60 | 60 | | | | | | | | | | | |
| | 56 | 56 | | | | | | | | | | | |
| B : témoin de non-toxicité du neutralisant | 54 | 54 | | | | | | | | | | | |
| | 63 | 63 | | | | | | | | | | | |
| C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 50 % | 61 | 61 | | | | | | | | | | | |
| | 55 | 55 | | | | | | | | | | | |
| Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | Na = $\frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$ | | 2,3E+04 | < | 1,4E+02 | < | 1,4E+02 | | | |
| | | | | Log N0 = 7,3 | | Log Na = | 4,4 | | 2,1 | | 2,1 | | |
| | | | | Calcul de réduction = Log N ₀ - Log Na = Log R | | 2,9 | > | 5,2 | > | 5,2 | | | |

Calculs: $Nv = \frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml). $N_{0}, A, B, C = \frac{c}{n}$ (en UFC/ml).

$NvB = \frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml).

C : somme des valeurs Vc prises en compte n : nombre de boîtes considérées

SUITE A DONNER :
VISA : **Conforme**

Staphylococcus aureus - 30 secondes

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation Décembre 2015

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation Décembre 2015

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

Numéro d'identification: **3335 16 05 13727** Date: **31.05.16**
Type de produit testé : Lavage des mains
Méthode utilisée : Classique
Température : Inférieure à 40°C
Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boîte | | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|------------------------|-------------|-------------|
| | Dilution -6 | Dilution -7 | Dilution -6 | Dilution -7 |
| Staphylococcus aureus CIP 483 | 163 | 14 | 163 | 14 |
| | 185 | 17 | 185 | 17 |
| Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | |

| Nv | C | | | N ₀ = | UFC/mL |
|-----|-------|---|---------|------------------|--------|
| Nv | 940 | = | 4,7E+02 | 4,7E+01 | UFC/mL |
| NvB | 87000 | = | 4,4E+04 | | UFC/mL |
| A | 91 | = | 4,6E+01 | | UFC/mL |
| B | 109 | = | 5,5E+01 | | UFC/mL |
| C | 95 | = | 4,8E+01 | | UFC/mL |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 379
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution 2
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution 2
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte :10⁶
Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{379}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^6} = 1,7E+08$ UFC/ml N₀=N¹⁰= 1,7E+07

Interprétation :
N est compris entre 1,5.10⁸ UFC/ml et 5.10⁸ UFC/ml 1,7E+08 Oui
Nv est compris entre 3.10² et 1,6.10³ 4,7E+02 Oui
NvB est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 4,4E+04 Oui
Nv0 est compris entre 3.10¹ et 1,6.10² 4,7E+01 Oui
A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 4,6E+01 et 4,8E+01 Oui
B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB 5,5E+01 Oui
La neutralisation est validée : Oui

$$5 < Q = \frac{\text{dil} - 6 / 2}{\text{dil} - 7 / 2} < 15 = \frac{174}{15,5} = 11,2$$

Essai de validation : Temps de contact : **VL 30"** Essai : Temps de contact : **VL 30"**

| | De 14 à 330 UFC par boîte | | Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 10 ml de la fiole à 50% | | 50 ml de la fiole à 50% | | 62,5 | | | |
|--|---|--|---|----|---|-----|-------------------------|---------|------|---------|----|--|
| | | | | | Concentration produit % | | 5 | | 25 | | 50 | |
| Nv : témoin suspension | 45 | 45 | Dénombrement à 20h/24h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | 57 | 72 | 0 | 0 | | |
| | 49 | 49 | | -1 | 226 | 232 | 4 | 6 | 0 | 0 | | |
| | | | | -2 | 25 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| NvB : témoin suspension B | 46 | 46 | Dénombrement à 40h/48h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | 57 | 72 | 0 | 0 | | |
| | 41 | 41 | | -1 | 226 | 232 | 4 | 6 | 0 | 0 | | |
| | | | | -2 | 25 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| A : témoin des conditions expérimentales | 44 | 44 | | | | | | | | | | |
| | 47 | 47 | | | | | | | | | | |
| B : témoin de non-toxicité du neutralisant | 56 | 56 | | | | | | | | | | |
| | 53 | 53 | | | | | | | | | | |
| C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 50 % | 47 | 47 | | | | | | | | | | |
| | 48 | 48 | | | | | | | | | | |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | Na = $\frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$ | | 2,3E+04 | 6,5E+02 | < | 1,4E+02 | | |
| Calculs | Nv = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml) | N ₀ , A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml) | Log N0 = 7,2 | | Log Na = | | 4,4 | 2,8 | | 2,1 | | |
| | NvB = $\frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml) | | Calcul de réduction = Log N ₀ - Log Na = Log R | | | | 2,8 | 4,4 | > | 5,1 | | |

C : somme des valeurs Vc prises en compte n : nombre de boîtes considérées

SUITE A DONNER :
VISA : **Conforme**

Enterococcus hirae - 30 secondes

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

Numéro d'identification: **3335 16 05 13727** Date: **31.05.16**
Type de produit testé: Lavage des mains
Méthode utilisée: Classique
Température: Inférieure à 40°C
Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boîte | | | |
|-----------------------------|---------------------------------------|------------------------|-------------|-------------|
| | Dilution -6 | Dilution -7 | Dilution -6 | Dilution -7 |
| Enterococcus hirae CIP 5855 | 171 | 20 | 171 | 20 |
| | 162 | 17 | 162 | 17 |
| Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | |

Numéro d'identification: **3335 16 05 13727**

| | | | | | | | |
|-----|---|-------------------|---|---------|------------------|---------|--------|
| Nv | C | $\frac{740}{2}$ | = | 3,7E+02 | N ₀ = | 3,7E+01 | UFC/mL |
| NvB | C | $\frac{82000}{2}$ | = | 4,1E+04 | | | UFC/mL |
| A | C | $\frac{71}{2}$ | = | 3,6E+01 | | | UFC/mL |
| B | C | $\frac{92}{2}$ | = | 4,6E+01 | | | UFC/mL |
| C | C | $\frac{95}{2}$ | = | 4,8E+01 | | | UFC/mL |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 370
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution 2
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution 2
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte :10⁶
Moyenne pondérée: $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{370}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^6} = 1,7E+08$ UFC/ml N₀=N¹⁰= 1,7E+07

Interprétation :
N est compris entre 1,5.10⁸ UFC/ml et 5.10⁸ UFC/ml 1,7E+08 Oui
Nv est compris entre 3.10² et 1,6.10³ 3,7E+02 Oui
NvB est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 4,1E+04 Oui
Nv0 est compris entre 3.10¹ et 1,6.10² 3,7E+01 Oui
A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 3,6E+01 et 4,8E+01 Oui
B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB 4,6E+01 Oui
La neutralisation est validée : Oui

$$5 < Q = \frac{\text{dil} - 6 / 2}{\text{dil} - 7 / 2} < 15 = \frac{166,5}{18,5} = 9,0$$

Essai de validation : Temps de contact : **VL 30"** Essai : Temps de contact : **VL 30"**

| | De 14 à 330 UFC par boîte | | Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 10 ml de la fiole à 50% | | 50 ml de la fiole à 50% | | 62,5 | | | |
|--|---------------------------|------------------------|--|---|-------------------------|--------------|-------------------------|---------|------|---------|----|--|
| | | | | | Concentration produit % | | 5 | | 25 | | 50 | |
| Nv : témoin suspension | 38 | 38 | Dénombrement à 20h/24h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | 191 | 164 | 112 | 97 | | |
| | 36 | 36 | | -1 | + | + | 13 | 15 | 5 | 6 | | |
| NvB : témoin suspension B | 43 | 43 | Dénombrement à 40h/48h de 14 à 330 UFC par boîte | -2 | 26 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 39 | 39 | | 0 | + | + | 191 | 164 | 112 | 97 | | |
| A : témoin des conditions expérimentales | 37 | 37 | -1 | + | + | 13 | 15 | 5 | 6 | | | |
| | 34 | 34 | -2 | 26 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| B : témoin de non-toxicité du neutralisant | 45 | 45 | 0 | + | + | 191 | 164 | 112 | 97 | | | |
| | 47 | 47 | -1 | + | + | 13 | 15 | 5 | 6 | | | |
| C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 50 % | 49 | 49 | -2 | 26 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| | 46 | 46 | | | | | | | | | | |
| Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | Na = $\frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$ | | 3,3E+04 | | 1,8E+03 | | 1,0E+03 | | |
| | | | | Log N0 = 7,2 | | Log Na = 4,5 | | 3,3 | | 3,0 | | |
| | | | | Calcul de réduction = Log N ₀ - Log Na = Log R | | 2,7 | | 3,9 | | 4,2 | | |

Calculs: $Nv = \frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml). $N_{0}, A, B, C = \frac{c}{n}$ (en UFC/ml).

$NvB = \frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml).

C : somme des valeurs Vc prises en compte n : nombre de boîtes considérées

SUITE A DONNER :
VISA : **Conforme**

Direction Scientifique

Liste des signataires du document



Nom_utilisateur : Chrystèle Pluchart
Titre : Responsable Laboratoire de Microbiologie
Date : mardi, 28 juin 2016, 14:51 Paris
Signification : Validation de document



Nom_utilisateur : Gaetan Rauwel
Titre : Directeur Recherche et Développement
Date : mardi, 28 juin 2016, 15:51 Paris
Signification : Validation de document

=====
N Demande : 34172
Rapport d'essai : A 16 91 13727

Etude : NF EN 13727

Date du document : 27/06/2016
=====

Laboratoires ANIOS

Pavè du Moulin

59260 Lille-Hellemmes

CUSTOMER NUMBER
314

DATE
June 17, 2016

REPORT A 16175

DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4 %

APPLICATION: 3 ML / 30 S

HYGIENIC HANDWASH (EN 1499:2013)

Objective

The efficacy of the hygienic handwash product **Dermanios Scrub Chlorhexidine 4 %** (Laboratoires ANIOS, Lille-Hellemmes, France) should be evaluated by a test simulating practical conditions in accordance with the **EN 1499 (2013)**.

Test description

Manufacturer: Laboratoires ANIOS, Lille-Hellemmes, Lyon, France

Product: Dermanios Scrub Chlorhexidine 4 %

Sample number: P 160318

Batch number: T06215

Manufacturer Date: March 2015

Best before: March 2018

Date of order: May 25, 2016

Date of delivery: February 03, 2016

Test date: June 16, 2016 – June 17, 2016

Basis: EN 1499 (2013): Chemical disinfectants and antiseptics – Hygienic handwash – test method and requirements (phase 2, step 2)

Test organism: *Escherichia coli* K 12 NCTC 10538

Test solutions: 100 %

Active ingredients: 40 mg/g chlorhexidine digluconate

Odour: fresh and sweetish

Appearance: pink liquid

Appearance of dilutions: slightly pink liquids

pH – value (pH-meter): 100 %: 5.18 50 %: 5.21 10 %: 5.31 WFI: 6.07

Neutralizer: 4 % Tween80 + 3 % Saponin + 3 % Histidin + 0.4 Lecthin + 0.5 % SDS
(Neutralizer XXXII)

Test temperature: 20 ± 1 °C

Incubation temperature: 36 ± 1 °C

Test Method

A cross-over design was used for the testing of **Dermanios Scrub Chlorhexidine 4 %**. The subjects were randomly divided into two groups of approximately the same size. The test was first performed with group 1 using the reference handwash procedure and group 2 using the handwash procedure with the test product **Dermanios Scrub Chlorhexidine 4 %**. The test was repeated on the same day, with group 1 applying the handwash procedure with the test product **Dermanios Scrub Chlorhexidine 4 %** and group 2 using the reference handwash procedure.

The test was performed on 15 healthy persons with hands with healthy skin, without cuts or abrasions, and with short and clean fingernails.

Application of the contamination fluid:

Hands were prepared by washing for 1 min with 5 ml soft soap (according to EN 1499) to remove natural transients and then dried on paper towels. Hands were immersed in the contamination fluid for 5 s and then allowed to dry in the air for 3 min, avoiding the formation of droplets.

Contamination fluid: **2.93*10⁸ cfu / ml**

Prevalues:

Immediately after drying, the fingertips were rubbed (including the thumb) for 1 min on the base of a Petri dish containing 10 ml of TSB (without neutralizer) in order to assess the release of test organisms before treatment of the hands with the test products (prevalues). A separate dish was used for each hand.

Dilutions of 10⁻³ and 10⁻⁴ of these sampling fluids were prepared in TSB. For each dilution, 0.1 ml were plated on the surface of TSA plate. The plates were incubated at 36±1°C for 24 h.

Hygienic handwash procedure:

Reference product (R):

Application: 5 ml of soft soap were poured into dry cupped hands. Hands were washed in accordance with the standard handwash procedure.

After 60 s, this procedure was completed by a 10 s rinse of the hands under running tap water. Fingertips remained pointing upwards until sampling for postvalues; wrists and lower arms were dried with paper towels by a helper.

Test product (P)

application: 3 ml of product **Dermanios Scrub Chlorhexidine 4 %** were poured into the cupped hands, which had been wetted with tap water before. Hands were then washed in accordance with the standard handwash procedure for 30 s.

According to the test standard, that procedure was completed by a 10 s rinse of the hands under running tap water (cold). Fingertips remained pointing upwards until sampling for postvalues; wrists and lower arms were dried with paper towels by a helper.

Postvalue

After the hygienic handwash procedure the fingertips und thumb tips were rubbed for 1 min on the base of a Petri dish containing 10 ml of TSB (with neutralizer). A separate dish was used for each hand.

1.0 ml and 0.1 ml samples of the undiluted sampling fluid and 0.1 ml of a 10^{-1} dilution in TSB were plated on the surface of TSA plates. The plates were incubated at 36 ± 1 °C for 24 h.

Results

The results are valid as the following requirements according to the EN 1499 (2013) were fulfilled (table 2):

- all results (from at least 12 volunteers) shall be available
- the overall mean of the log prevalues for reference and test procedure is at least 5.00
- the absolute difference of mean differences between log reductions of RP and PP of group RP → PP and group PP → RP is be less than 2.00
- no systematic errors were detected by the calculation of the quotients of cfu numbers of consecutive dilutions of the sampling fluids.

The overall mean values of the reference product are:

| | |
|------------------|------|
| prevalue | 5.98 |
| postvalue | 3.18 |
| reduction factor | 2.80 |

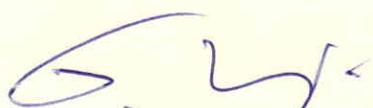
The overall mean values of the test product **Dermanios Scrub Chlorhexidine 4 %** are:

| | |
|------------------|------|
| prevalue | 6.03 |
| postvalue | 1.23 |
| reduction factor | 4.80 |

The mean log reduction (RF) for the test product **Dermanios Scrub Chlorhexidine 4 %** is greater than that of the reference product. According to the Wilcoxon-Wilcox statistical test at the required probability level of $p = 0.01$ (1-tailed), this difference is considered significant (rank sum = 0.00, $p = 0.000$; required: $p \leq 0.01$).

In accordance with these results, the product **Dermanios Scrub Chlorhexidine 4 %** is suitable for the **hygienic handwash** when hands are kept moist with **3 ml** (on wetted hands) for a contact time of **30 s**. **Dermanios Scrub Chlorhexidine 4 %** does therefore correspond to the requirements of the EN 1499 (2013).

Greifswald, June 16, 2016


Dr. rer. med. (Dipl. Biol.) Torsten Koburger-Janssen
- General Manager -


Prof. Dr. med. A. Kramer
MD for Hygiene and Environmental Medicine -

ixel Vira

Table 1: Neutralization–control and validation (EN 1499:2013)

| | | | |
|--|-----------------------------------|------------------|-------------|
| Date: | April 08, 2016 | Order number: | A 16175 |
| Product: | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4 % | Sample number: | P 160318 |
| Test organism: | <i>E. coli</i> | Batch number: | T06215 |
| Interfering substance: | none | Neutralizer: | XXXII |
| Incubation temperature: | 36 ± 1 °C | Incubation time: | 24 h – 48 h |
| Test suspension (N): | 5.56*10 ⁸ cfu / ml | Test temperature | 20 ± 1 °C |
| Test suspension (N _v): | 1.59*10 ⁵ cfu / ml | | |
| Validation Suspension (N _v): | 1.59*10 ³ cfu / ml | | |

Neutralization – control and validation:

| Validation suspension (N _{v0}) | | | | Neutralizer control (control B) | | | | Method validation (Control C) 80 % | | | | | |
|---|-------------------|----|----------------|---|-------------------|----|----------------|---|-------------------|-----------------|----------------|----|-----|
| | cfu / Plate 1 & 2 | | V _c | | cfu / Plate 1 & 2 | | V _c | | cfu / Plate 1 & 2 | | V _c | | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| V _{c1} | 88 | 84 | 172 | 158.5 | V _{c1} | 81 | 57 | 138 | 141 | V _{c1} | 80 | 67 | 147 |
| V _{c2} | 75 | 70 | 145 | | V _{c2} | 75 | 69 | 144 | | V _{c2} | 71 | 74 | 145 |
| 30 ≤ \bar{x} of N _{v0} ≤ 160? | | | | \bar{x} of B is ≥ 0.0005 \bar{x} of N _{v0} ? | | | | \bar{x} of C is ≥ 0.5 \bar{x} of N _{v0} ? | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No | | | | <input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No | | | | <input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No | | | | | |
| Method validation (Control C) 50 % | | | | | | | | | | | | | |
| | cfu / Plate 1 & 2 | | V _c | | cfu / Plate 1 & 2 | | V _c | | cfu / Plate 1 & 2 | | V _c | | |
| V _{c1} | 75 | 81 | 156 | 153.5 | V _{c1} | 75 | 76 | 151 | 159 | V _{c1} | 85 | 81 | 166 |
| V _{c2} | 75 | 76 | 151 | | V _{c2} | 75 | 77 | 152 | | V _{c2} | 75 | 77 | 152 |
| \bar{x} of C is ≥ 0.5 \bar{x} of N _{v0} ? | | | | | | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No | | | | | | | | | | | | | |
| Method validation (Control C) 10 % | | | | | | | | | | | | | |
| | cfu / Plate 1 & 2 | | V _c | | cfu / Plate 1 & 2 | | V _c | | cfu / Plate 1 & 2 | | V _c | | |
| V _{c1} | 85 | 81 | 166 | 159 | V _{c1} | 85 | 81 | 166 | 159 | V _{c1} | 85 | 81 | 166 |
| V _{c2} | 75 | 77 | 152 | | V _{c2} | 75 | 77 | 152 | | V _{c2} | 75 | 77 | 152 |
| \bar{x} of C is ≥ 0.5 \bar{x} of N _{v0} ? | | | | | | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No | | | | | | | | | | | | | |

Control of group of subjects (EN 1499:2013)

| Group 1 (RP → PP) subjects 1 - 8 | | | Group 2 (PP → RP) subjects 9 - 15 | | | Absolute difference of mean differences |
|-------------------------------------|------|------------|--------------------------------------|------|------------|---|
| mean log ₁₀ RF | | difference | mean log ₁₀ RF | | difference | abs(-1.69 - (- 2.35)) = 0.56 |
| RP | PP | | RP | PP | | |
| 2.90 | 4.59 | -1.69 | 2.69 | 5.04 | -2.35 | result < 2.00 ? |
| | | | | | | <input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No |

Table 2: Hygienic handwash – test results – reference product vs. test product

test date: June 16, 2016
 reference: soft soap
 test product: Dermanios Scrub Chlorhexidine 4 %
 neutralizer: XXXII

order number: A 16175
 batch number:
 batch number: T06215
 sample number: P 160318

| subject | hand | reference product | | | | | test product | | | | |
|---------|-------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | | prevalue [cfu] | | postvalue [cfu] | | | prevalue [cfu] | | postvalue [cfu] | | |
| | | 0.1 ml 10 ⁻³ | 0.1 ml 10 ⁻⁴ | 1 ml 10 ⁰ | 0.1 ml 10 ⁰ | 0.1 ml 10 ⁻¹ | 0.1 ml 10 ⁻³ | 0.1 ml 10 ⁻⁴ | 1 ml 10 ⁰ | 0.1 ml 10 ⁰ | 0.1 ml 10 ⁻¹ |
| 1 | right | 154 | 9 | > 330 | 126 | 21 | 149 | 21 | > 330 | 60 | 6 |
| | left | 138 | 12 | > 330 | 122 | 14 | 120 | 14 | > 330 | 101 | 12 |
| 2 | right | 26 | 3 | > 330 | 118 | 12 | 18 | 3 | 64 | 7 | 0 |
| | left | 29 | 2 | > 330 | 92 | 11 | 41 | 5 | 38 | 7 | 0 |
| 3 | right | 160 | 17 | > 330 | 107 | 24 | > 330 | 43 | 70 | 10 | 1 |
| | left | 166 | 21 | > 330 | 129 | 12 | 203 | 37 | 68 | 8 | 0 |
| 4 | right | 63 | 7 | > 330 | 128 | 17 | 129 | 12 | 20 | 2 | 0 |
| | left | 69 | 5 | > 330 | 99 | 10 | 91 | 12 | 10 | 0 | 0 |
| 5 | right | 116 | 10 | > 330 | 67 | 4 | 153 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| | left | 138 | 12 | > 330 | 51 | 2 | > 330 | 48 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | right | 99 | 12 | > 330 | > 330 | 49 | 69 | 5 | 124 | 11 | 2 |
| | left | 65 | 5 | > 330 | 178 | 12 | 70 | 5 | 80 | 8 | 1 |
| 7 | right | 165 | 18 | > 330 | > 330 | 47 | 198 | 25 | 10 | 1 | 0 |
| | left | 129 | 17 | > 330 | 262 | 31 | 121 | 23 | 10 | 0 | 0 |
| 8 | right | 76 | 6 | 320 | 50 | 4 | 113 | 12 | 14 | 1 | 0 |
| | left | 80 | 12 | 256 | 32 | 3 | 102 | 11 | 30 | 2 | 0 |
| 9 | right | 51 | 4 | > 330 | 66 | 7 | 49 | 7 | 234 | 24 | 2 |
| | left | 52 | 7 | > 330 | 87 | 8 | 56 | 3 | 248 | 17 | 3 |
| 10 | right | 45 | 4 | > 330 | 49 | 4 | 50 | 4 | 4 | 0 | 0 |
| | left | 77 | 6 | > 330 | 63 | 5 | 73 | 9 | 2 | 0 | 0 |
| 11 | right | 59 | 5 | > 330 | 297 | 38 | 49 | 3 | 12 | 2 | 0 |
| | left | 61 | 8 | > 330 | > 330 | 45 | 64 | 6 | 12 | 4 | 0 |
| 12 | right | > 330 | 57 | > 330 | > 330 | 147 | > 330 | 61 | 18 | 1 | 0 |
| | left | 191 | 29 | > 330 | > 330 | 330 | > 330 | 51 | 20 | 1 | 0 |
| 13 | right | 130 | 14 | > 330 | 183 | 23 | 107 | 8 | 16 | 1 | 0 |
| | left | 138 | 24 | > 330 | 200 | 25 | 122 | 15 | 32 | 1 | 0 |
| 14 | right | 51 | 7 | > 330 | 87 | 9 | 39 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | left | 74 | 6 | > 330 | 86 | 8 | 36 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | right | 208 | 22 | > 330 | > 330 | 48 | 136 | 19 | 0 | 0 | 0 |
| | left | 223 | 30 | > 330 | 163 | 13 | 168 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | right | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | left | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 17 | right | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | left | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 18 | right | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | left | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 19 | right | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | left | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20 | right | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | left | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Table 3: Hygienic hand wash – test results (logarithms and reduction factors) reference product vs. test product

test product: Dermanios Scrub Chlorhexidine 4 %
reference: soft soap

sample number: P 160318
order number: A 16175

| subject | hand | reference product | | | | | test product | | | | |
|--------------|------|-------------------|------|---------------|------|-------------------|--------------|------|---------------|------|-------------------|
| | | prevalue log | | postvalue log | | reduction-factors | prevalue log | | postvalue log | | reduction-factors |
| | | R/L | mean | R/L | mean | | R/L | mean | R/L | mean | |
| 1 | R | 6.19 | 6.16 | 3.13 | 3.11 | 3.05 | 6.19 | 6.14 | 2.78 | 2.89 | 3.25 |
| | L | 6.14 | | 3.09 | | | 6.09 | | 3.00 | | |
| 2 | R | 5.41 | 5.44 | 3.07 | 3.02 | 2.42 | 5.26 | 5.43 | 1.81 | 1.69 | 3.74 |
| | L | 5.46 | | 2.96 | | | 5.61 | | 1.58 | | |
| 3 | R | 6.21 | 6.22 | 3.08 | 3.09 | 3.13 | 6.63 | 6.49 | 1.85 | 1.84 | 4.65 |
| | L | 6.23 | | 3.11 | | | 6.34 | | 1.83 | | |
| 4 | R | 5.80 | 5.82 | 3.12 | 3.06 | 2.76 | 6.11 | 6.03 | 1.30 | 1.15 | 4.88 |
| | L | 5.84 | | 3.00 | | | 5.96 | | 1.00 | | |
| 5 | R | 6.06 | 6.10 | 2.83 | 2.77 | 3.34 | 6.18 | 6.43 | 0.00 | 0.00 | 6.43 |
| | L | 6.14 | | 2.71 | | | 6.68 | | 0.00 | | |
| 6 | R | 6.00 | 5.90 | 3.69 | 3.47 | 2.43 | 5.84 | 5.84 | 2.09 | 2.00 | 3.84 |
| | L | 5.81 | | 3.25 | | | 5.85 | | 1.90 | | |
| 7 | R | 6.22 | 6.17 | 3.67 | 3.55 | 2.62 | 6.31 | 6.21 | 1.00 | 1.00 | 5.21 |
| | L | 6.12 | | 3.43 | | | 6.12 | | 1.00 | | |
| 8 | R | 5.88 | 5.89 | 2.53 | 2.47 | 3.42 | 6.05 | 6.03 | 1.15 | 1.31 | 4.72 |
| | L | 5.90 | | 2.42 | | | 6.01 | | 1.48 | | |
| 9 | R | 5.71 | 5.71 | 2.82 | 2.88 | 2.83 | 5.69 | 5.72 | 2.37 | 2.38 | 3.34 |
| | L | 5.72 | | 2.94 | | | 5.75 | | 2.38 | | |
| 10 | R | 5.65 | 5.77 | 2.69 | 2.74 | 3.03 | 5.70 | 5.78 | 0.60 | 0.45 | 5.33 |
| | L | 5.89 | | 2.80 | | | 5.86 | | 0.30 | | |
| 11 | R | 5.77 | 5.78 | 3.48 | 3.57 | 2.21 | 5.69 | 5.75 | 1.08 | 1.08 | 4.67 |
| | L | 5.79 | | 3.65 | | | 5.81 | | 1.08 | | |
| 12 | R | 6.76 | 6.53 | 4.17 | 4.34 | 2.19 | 6.79 | 6.75 | 1.26 | 1.28 | 5.47 |
| | L | 6.30 | | 4.52 | | | 6.71 | | 1.30 | | |
| 13 | R | 6.12 | 6.14 | 3.27 | 3.29 | 2.85 | 6.03 | 6.06 | 1.20 | 1.35 | 4.71 |
| | L | 6.17 | | 3.31 | | | 6.10 | | 1.51 | | |
| 14 | R | 5.71 | 5.79 | 2.94 | 2.94 | 2.85 | 5.59 | 5.57 | 0.00 | 0.00 | 5.57 |
| | L | 5.87 | | 2.93 | | | 5.56 | | 0.00 | | |
| 15 | R | 6.32 | 6.34 | 3.68 | 3.45 | 2.89 | 6.15 | 6.19 | 0.00 | 0.00 | 6.19 |
| | L | 6.36 | | 3.21 | | | 6.23 | | 0.00 | | |
| 16 | R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | L | - | | - | | | - | | - | | |
| 17 | R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | L | - | | - | | | - | | - | | |
| 18 | R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | L | - | | - | | | - | | - | | |
| 19 | R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | L | - | | - | | | - | | - | | |
| 20 | R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | L | - | | - | | | - | | - | | |
| arithm. mean | | 5.98 | | 3.18 | | 2.80 | 6.03 | | 1.23 | | 4.80 |
| absolute SD | | 0.28 | | 0.45 | | 0.37 | 0.36 | | 0.87 | | 0.95 |
| relative SD | | 4.74 | | 14.23 | | 13.30 | 5.93 | | 70.51 | | 19.86 |

SD standard deviation

R right

L left

Table 4: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks Test

Calculation using SPSS 13.0:

| Ranks | | | | Test Statistics ^b | | |
|--|----------------|-----------------|-----------|------------------------------|------------------------|---------------------|
| | | N | Mean Rank | Sum of Ranks | R - P | |
| R - P | Negative Ranks | 15 ^a | 8,00 | 120,00 | Z | -3,408 ^a |
| | Positive Ranks | 0 ^b | ,00 | ,00 | Asymp. Sig. (2-tailed) | ,001 |
| | Ties | 0 ^c | | | Exact Sig. (2-tailed) | ,000 |
| | Total | 15 | | | Exact Sig. (1-tailed) | ,000 |
| a. R < P b. R > P c. R = P | | | | | | |
| a. Based on positive ranks. b. Wilcoxon Signed Ranks Test | | | | | | |

For the calculated smaller sum of ranks (sum of positive ranks = 0.00), the p-value was determined with $p = 0.000$ (1-tailed). As this value does reach and fall below the required level of significance of $p = 0.01$, P is significantly more effective than R.

Calculation using the EN 1499 - Layout:

| Subject | log RF derived from | | Difference R - P | Rank of Difference | |
|--------------------------|---------------------|------|---------------------|--------------------|-----------|
| | R | P | | without sign | with sign |
| 1 | 3.05 | 3.25 | -0.20 | 1 | -1 |
| 2 | 2.42 | 3.74 | -1.32 | 4 | -4 |
| 3 | 3.13 | 4.65 | -1.52 | 6 | -6 |
| 4 | 2.76 | 4.88 | -2.12 | 8 | -8 |
| 5 | 3.34 | 6.43 | -3.09 | 13 | -13 |
| 6 | 2.43 | 3.84 | -1.41 | 5 | -5 |
| 7 | 2.62 | 5.21 | -2.59 | 11 | -11 |
| 8 | 3.42 | 4.72 | -1.30 | 3 | -3 |
| 9 | 2.83 | 3.34 | -0.51 | 2 | -2 |
| 10 | 3.03 | 5.33 | -2.30 | 9 | -9 |
| 11 | 2.21 | 4.67 | -2.46 | 10 | -10 |
| 12 | 2.19 | 5.47 | -3.28 | 14 | -14 |
| 13 | 2.85 | 4.71 | -1.86 | 7 | -7 |
| 14 | 2.85 | 5.57 | -2.72 | 12 | -12 |
| 15 | 2.89 | 6.19 | -3.30 | 15 | -15 |
| Sum of ranks [-]: 120.00 | | | | | |
| Sum of ranks [+]: 0.00 | | | | | |

The tabulated value for the smaller sum of ranks for $n = 15$ in the Wilcoxon test is 19 at a significance level of $p = 0.01$ in the directional test. As the calculated sum of ranks does reach and fall below this value (sum of ranks [+] = 0.00), P is significantly more effective than R.

Legend:

| | | |
|-----------|---|------------------|
| x | = | average value |
| \bar{x} | = | average value |
| RF | = | reduction factor |
| R | = | reduction factor |
| > 330 | = | not countable |
| n.d. | = | not determined |
| E | = | self-inhibition |

Sainghin en Mélantois, le 27 juin 2016
Sainghin en Mélantois, on the June 27th 2016

Rapport d'essai : N° A 16 92 13727
Test report : N° A 16 92 13727

1. **Objet de la demande (Study Number) n° 34173**

Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de la formule **2173**. Méthode d'essai et prescriptions (phase 2 - étape 1) NF EN 13727 + A2 (Décembre 2015). Application aux désinfectants chimiques pour le lavage chirurgical des mains.

Indice de classement T 72-175.
Méthode par dilution neutralisation.

*Chemical antiseptics and disinfectants. Quantitative suspension test for the evaluation of the bactericidal activity of the formula **2173**. Test method and prescriptions (phase 2 - step 1) according to NF EN 13727 + A2 (December 2015). Application to chemical disinfectants for the surgical handwash. Classification index T 72-175.*

Method by dilution neutralisation.

Ce rapport d'essai ne concerne que le produit (cité ci après) soumis à l'essai.
This trial report concerns only the product (quoted this later) subjected on approval

Ce document comporte 11 pages numérotées dont 1 annexe de 4 pages
This report is made of 11 numbered pages including 1 annex of 4 pages

La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous la forme de fac- similé photographique intégral. Seule la version électronique fait foi.
The reproduction of this trial report is authorized only under the shape of complete photographic reproduction Only the electronic version is valid.

2. Sommaire (Summary)

| | |
|---|---|
| 1. Objet de la demande (<i>Study Number</i>) n° 34173 | 1 |
| 2. Sommaire (<i>Summary</i>) | 2 |
| 3. Introduction (<i>Introduction</i>) | 3 |
| 4. Identification de l'échantillon (<i>Sample Identification</i>) | 3 |
| 5. Méthode expérimentale (<i>Experimental Method</i>) | 4 |
| 5.1. Conditions expérimentales (<i>Experimental conditions</i>) | 4 |
| 5.2. Méthode par dilution neutralisation (<i>Method by dilution neutralisation</i>) | 4 |
| 6. Résultats (<i>Results</i>) | 5 |
| 6.1. Essais de validation des conditions expérimentales (<i>Validation tests</i>) | 5 |
| 6.2. Essais d'activité bactéricide (<i>Evaluation of bactericidal activity</i>) | 6 |
| 7. Conclusion (Conclusion) | 6 |
| 8. Annexe - Données expérimentales (Experimental Data) | 6 |

3. Introduction (*Introduction*)

L'essai a été réalisé selon la méthode d'essai décrite dans la norme européenne EN 13727 + A2 « Désinfectants chimiques et antiseptiques- Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide en médecine (phase 2 /Etape 1) » .

Détermination de l'activité bactéricide dans les conditions de laboratoire définies par la présente norme européenne .

The test was realised according to the test method described in the European standard EN 13727 + A2 « Chemical disinfectants and antiseptics- Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area».

Determination of the bactericidal activity in the laboratory conditions defined in the present European standard .

4. Identification de l'échantillon (*Sample Identification*)

| | |
|---|--|
| Code formule | 2173 |
| <i>Code formula</i> | |
| Numéro d'identification de l'échantillon | 3336 16 05 13727 |
| <i>Identification of the sample</i> | |
| Numéro de lot | U132.04 |
| <i>Batch number</i> | |
| Fabricant | Laboratoires ANIOS |
| <i>Manufacturer</i> | |
| Date de réception au laboratoire | Le 25/05/16 |
| <i>Receipt date at the laboratory</i> | <i>On the 25/05/16</i> |
| Conditions de stockage au laboratoire | T° ambiante et obscurité |
| <i>Storage conditions at the laboratory</i> | <i>Room temperature and darkness</i> |
| Substances actives | Digluconate de Chlorhexidine (CAS : 18472-51-0) : 40mg/g |
| <i>Activ substances</i> | <i>Chlorhexidine digluconate (CAS : 18472-51-0) : 40mg/g</i> |
| Période d'essai | Du 31/05/16 au 17/06/16 |
| <i>Period of analysis</i> | <i>From 31/05/16 to 17/06/16</i> |

5. Méthode expérimentale (Experimental Method)

5.1. Conditions expérimentales (Experimental conditions)

| | |
|---|--|
| Température de l'essai | 20°C ± 1°C |
| <i>Test temperature</i> | |
| Temps de contact | 1 minute ± 5s |
| <i>Contact Time</i> | |
| Diluant de la formule lors des essais | Eau dure |
| <i>Diluent of the formula used during the test</i> | <i>Hard water</i> |
| Apparence de la formule et de ses dilutions | Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai |
| <i>Appearance formula dilutions</i> | <i>Preparation physically homogeneous and stable during test</i> |
| Souches testées | <ul style="list-style-type: none">○ Escherichia coli K12 54117○ Pseudomonas aeruginosa CIP 103467○ Enterococcus hirae CIP 5855○ Staphylococcus aureus CIP 483 |
| <i>Tested strains</i> | |
| Substance interférente | Albumine bovine à 3g/l + 3ml/l érythrocytes |
| <i>Interfering substance</i> | <i>3 g/l BSA + 3ml/l erythrocytes</i> |
| Stabilité du mélange formule et substances interférentes | Absence de précipité pendant l'essai |
| <i>Stability of the mixture (formula and interfering substance)</i> | <i>Precipitate absent throughout the test</i> |
| Température d'incubation | 37°C ± 1°C |
| <i>Incubation temperature</i> | <i>37°C ± 1°C</i> |

5.2. Méthode par dilution neutralisation (Method by dilution neutralisation)

| | |
|---|---|
| Nature du neutralisant utilisé | <ul style="list-style-type: none">○ Formule : F010 |
| <i>Nature of the neutralizer agent used</i> | <ul style="list-style-type: none">○ <i>Formula : F010</i> |
| Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement | ∅ |
| <i>Neutralizer agent added to the counting medium</i> | <i>∅</i> |

6. Résultats (Results)

6.1. Essais de validation des conditions expérimentales (Validation tests)

Vérification de la méthodologie et validation de la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **50%** de la formule **2173** soumise à l'essai.

Checking of the method and validation of the method by dilution neutralisation for the **50%** test concentration of the formula **2173** to be tested.

| | Nombre de cellules viables (UFC/ml) (Number of viable cells(CFU/ml)) | | | | | | | |
|-------------------------------|--|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--|
| Souches testées | Suspension d'essai | Suspension d'essai / 10 | Suspension de validation | Suspension de validation / 10 | Suspension de validation B | Validation conditions expérimentales | Non toxicité du neutralisant | Inactivation par dilution neutralisation |
| Tested strains | Test suspension | Test suspension / 10 | Validation suspension | Validation suspension / 10 | B Validation suspension | Experimental conditions control | Neutralizer toxicity control | Dilution neutralization control |
| | N | N ₀ | N _v | N _{v0} | N _{vB} | A | B | C |
| Escherichia coli K12 | 1,6.10 ⁸ | 1,6.10 ⁷ | 4,5.10 ² | 4,5.10 ¹ | 4,4.10 ⁴ | 4,2.10 ¹ | 4,1.10 ¹ | 4,4.10 ¹ |
| Pseudomonas aeruginosa | 2,1.10 ⁸ | 2,1.10 ⁷ | 5,6.10 ² | 5,6.10 ¹ | 5,9.10 ⁴ | 6,0.10 ¹ | 5,9.10 ¹ | 6,5.10 ¹ |
| Enterococcus hirae | 1,7.10 ⁸ | 1,7.10 ⁷ | 3,7.10 ² | 3,7.10 ¹ | 4,1.10 ⁴ | 3,9.10 ¹ | 4,6.10 ¹ | 4,6.10 ¹ |
| Staphylococcus aureus | 1,7.10 ⁸ | 1,7.10 ⁷ | 4,7.10 ² | 4,7.10 ¹ | 4,4.10 ⁴ | 4,4.10 ¹ | 5,5.10 ¹ | 5,2.10 ¹ |

Pour les souches soumises à l'essai - For the tested strains.

N est compris entre 1,5 x 10⁸ UFC/ml et 5 x 10⁸ UFC/ml
is comprised between 1.5 x 10⁸ CFU/ml and 5 x 10⁸ CFU/ml

N₀ est compris entre 1,5 x 10⁷ UFC/ml et 5 x 10⁷ UFC/ml
is comprised between 1.5 x 10⁷ CFU/ml and 5 x 10⁷ CFU/ml

N_v est compris entre 3 x 10² UFC/ml et 1.6 x 10³ UFC/ml
is comprised between 3 x 10² CFU/ml and 1.6 x 10³ CFU/ml

N_{v0} est compris entre 3 x 10¹ UFC/ml et 1.6 x 10² UFC/ml
is comprised between 3 x 10¹ CFU/ml and 1.6 x 10² CFU/ml

N_{vB} est compris entre 3 x 10⁴ UFC/ml et 1.6 x 10⁵ UFC/ml
is comprised between 3 x 10⁴ CFU/ml and 1.6 x 10⁵ CFU/ml

B est supérieur ou égal à 0,0005 x N_{vB}
are higher or equal to 0,0005 x N_{vB}

A,C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x N_{v0}
are higher or equal to 0.5 x N_{v0}

La neutralisation est validée avec la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **50%** de la formule **2173** et pour les souches soumises à l'essai.

The neutralization is validated with the method by dilution neutralisation for the **50%** test concentration of the formula **2173** and for the tested strains.

6.2. Essais d'activité bactéricide (*Evaluation of bactericidal activity*)

| Souches testées | Nombre de cellules viables (UFC/ml) pour le mélange d'essai (Na) pour les concentrations de : %(v/v) | | |
|-------------------------------|--|----------------------|----------------------|
| Tested strains | Number of the viable cells (CFU/ml) for the test mixture (Na) for the concentrations of : %(v/v) | | |
| | 5 | 25 | 50 |
| Escherichia coli K12 | 7,2.10 ² | <1,4.10 ² | <1,4.10 ² |
| Pseudomonas aeruginosa | 8,4.10 ² | <1,4.10 ² | <1,4.10 ² |
| Enterococcus hirae | 4,1.10 ³ | <1,4.10 ² | <1,4.10 ² |
| Staphylococcus aureus | 1,4.10 ³ | <1,4.10 ² | <1,4.10 ² |

| | Réduction du nombre de cellule viables à la concentration d'essai. R = Log N0 - Log Na | | |
|-------------------------------|---|-----------------|-----------------|
| | Reduction of the number of viable cells at the test concentration. R = Log N0 - Log Na | | |
| | 5 | 25 | 50 |
| Escherichia coli K12 | 4,3 | <u>≥ 5,1</u> | <u>≥ 5,1</u> |
| Pseudomonas aeruginosa | 4,4 | <u>> 5,2</u> | <u>> 5,2</u> |
| Enterococcus hirae | 3,6 | <u>≥ 5,1</u> | <u>≥ 5,1</u> |
| Staphylococcus aureus | 4,1 | <u>≥ 5,1</u> | <u>≥ 5,1</u> |

7. Conclusion (Conclusion)

Selon la norme NF EN 13727 + A2 (Décembre 2015), la formule **2173**, lorsqu'elle est diluée à la concentration de 25,00% (v/v) dans de l'eau dure, présente une activité bactéricide en 1 minute de contact à 20°C en conditions de saleté, vis-à-vis des souches de référence pour le lavage chirurgical des mains : **Escherichia coli K12, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus hirae, Staphylococcus aureus**.

According to the European standard NF EN 13727 + A2 (December 2015), the formula **2173**, when diluted at the concentration of 25.00% (v/v) in hard water, presents a bactericidal activity in a 1 minute contact time at 20°C in dirty conditions against the referenced strains for the surgical handwash: **Escherichia coli K12, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus hirae, Staphylococcus aureus**.

8. Annexe - Données expérimentales (Experimental Data)

Escherichia coli K12 - 1 minute

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

Numéro d'identification: **3336 16 05 13727** Date: **15.06.16**
Type de produit testé: Lavage des mains
Méthode utilisée: Classique
Température: Inférieure à 40°C
Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boîte | | | |
|----------------------------|---------------------------------------|-------------|------------------------|-------------|
| | Dilution -6 | Dilution -7 | Dilution -6 | Dilution -7 |
| Escherichia coli K12 54117 | 154 | 17 | 154 | 17 |
| | 162 | 15 | 162 | 15 |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | |

Numéro d'identification: **3336 16 05 13727**

| | | | | | | | |
|-----|---|-------------------|---|---------|------------------|---------|--------|
| Nv | C | $\frac{890}{2}$ | = | 4,5E+02 | N ₀ = | 4,5E+01 | UFC/mL |
| NvB | C | $\frac{88000}{2}$ | = | 4,4E+04 | | | UFC/mL |
| A | C | $\frac{84}{2}$ | = | 4,2E+01 | | | UFC/mL |
| B | C | $\frac{82}{2}$ | = | 4,1E+01 | | | UFC/mL |
| C | C | $\frac{87}{2}$ | = | 4,4E+01 | | | UFC/mL |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 348
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution 2
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution 2
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte :10⁶
Moyenne pondérée: $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{348}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^6} = 1,6E+08$ UFC/ml N0=N10= $1,6E+07$

Interprétation:
N est compris entre 1,5.10⁸ UFC/ml et 5.10⁸ UFC/ml **1,6E+08** Oui
Nv est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ **4,5E+02** Oui
NvB est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ **4,4E+04** Oui
Nv0 est compris entre 3.10¹ et 1,6.10² **4,5E+01** Oui
A et C sont supérieures ou égales à 0,5 x Nv0 **4,2E+01 et 4,4E+01** Oui
B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB **4,1E+01** Oui
La neutralisation est validée : **Oui**

$$5 < Q = \frac{\text{dil} - 6/2}{\text{dil} - 7/2} < 15 = \frac{158}{16} = 9,9$$

Essai de validation : Temps de contact : **VL** **1'** Essai : Temps de contact : **VL** **1'**

| | De 14 à 330 UFC par boîte | | De 14 à 330 UFC par boîte | | Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 10 ml de la fiole à 50% | | 50 ml de la fiole à 50% | | 62,5 | |
|--|---------------------------|----|---------------------------|----|---|----------|-------------------------|----|-------------------------|---|---------|---|
| | | | | | Concentration produit % | | 5 | | 25 | | 50 | |
| Nv : témoin suspension | 47 | 47 | 47 | 47 | Dénombrement à 20h/24h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | 69 | 74 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 42 | 42 | 42 | 42 | | -1 | 8 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| NvB : témoin suspension B | 43 | 43 | 43 | 43 | Dénombrement à 40h/48h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | 69 | 74 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 45 | 45 | 45 | 45 | | -1 | 8 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A : témoin des conditions expérimentales | 41 | 41 | 41 | 41 | | | | | | | | |
| | 43 | 43 | 43 | 43 | | | | | | | | |
| B : témoin de non-toxicité du neutralisant | 38 | 38 | 38 | 38 | | | | | | | | |
| | 44 | 44 | 44 | 44 | | | | | | | | |
| C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 50 % | 47 | 47 | 47 | 47 | | | | | | | | |
| | 40 | 40 | 40 | 40 | | | | | | | | |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | | | | | | | | |
| | | | | | Na = $\frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$ | | 7,2E+02 | < | 1,4E+02 | < | 1,4E+02 | |
| | | | | | Log N0 = 7,2 | Log Na = | 2,9 | | 2,1 | | 2,1 | |
| | | | | | Calcul de réduction = Log N ₀ - Log Na = Log R | | 4,3 | > | 5,1 | > | 5,1 | |

Calculs Nv = $\frac{C \times 10}{n}$ (en UFC/ml). N₀, A, B, C = $\frac{C}{n}$ (en UFC/ml).

NvB = $\frac{C \times 1000}{n}$ (en UFC/ml).

C : somme des valeurs Vc prises en compte n : nombre de boîtes considérées

SUITE A DONNER :

VISA : **Conforme**

Pseudomonas aeruginosa - 1 minute

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

Numéro d'identification: **3336 16 05 13727** Date : **31.05.16**
Type de produit testé : Lavage des mains
Méthode utilisée : Classique
Température : Inférieure à 40°C
Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boîte | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------|-------------|-------------|
| | Dilution -6 | Dilution -7 | Dilution -6 | Dilution -7 |
| Pseudomonas aeruginosa CIP 103467 | 202 | 20 | 202 | 20 |
| | 214 | 23 | 214 | 23 |
| Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | |

Numéro d'identification: **3336 16 05 13727**

| | | | | | | | |
|-----|---|--------------------|---|---------|------------------|---------|--------|
| Nv | C | $\frac{1120}{2}$ | = | 5,6E+02 | N ₀ = | 5,6E+01 | UFC/mL |
| NvB | C | $\frac{117000}{2}$ | = | 5,9E+04 | | | UFC/mL |
| A | C | $\frac{119}{2}$ | = | 6,0E+01 | | | UFC/mL |
| B | C | $\frac{117}{2}$ | = | 5,9E+01 | | | UFC/mL |
| C | C | $\frac{129}{2}$ | = | 6,5E+01 | | | UFC/mL |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 459
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution 2
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution 2
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte :10⁶
Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{459}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^6} = 2,1E+08$ UFC/ml N₀=N/10⁶ = 2,1E+07

Interprétation :
N est compris entre 1,5.10⁸ UFC/ml et 5.10⁸ UFC/ml 2,1E+08 Oui
Nv est compris entre 3.10² et 1,6.10³ 5,6E+02 Oui
NvB est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 5,9E+04 Oui
Nv0 est compris entre 3.10¹ et 1,6.10² 5,6E+01 Oui
A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 6,0E+01 et 6,5E+01 Oui
B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB 5,9E+01 Oui
La neutralisation est validée : Oui

$$5 < Q = \frac{\text{dil} - 6 / 2}{\text{dil} - 7 / 2} < 15 = \frac{208}{21,5} = 9,7$$

Essai de validation : Temps de contact : **VL** **1'** Essai : Temps de contact : **VL** **1'**

| | De 14 à 330 UFC par boîte | | De 14 à 330 UFC par boîte | | Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 10 ml de la fiole à 50% | | 50 ml de la fiole à 50% | | 62,5 | |
|--|---------------------------|----|---------------------------|----|---|----------|-------------------------|----|-------------------------|---|---------|---|
| | | | | | | | | | | | | |
| Nv : témoin suspension | 55 | 57 | 55 | 57 | Concentration produit % | | 5 | 25 | 50 | | | |
| NvB : témoin suspension B | 59 | 58 | 59 | 58 | Dénombrement à 20h/24h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | 76 | 92 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 58 | 61 | 58 | 61 | | -1 | 9 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A : témoin des conditions expérimentales | 58 | 61 | 58 | 61 | Dénombrement à 40h/48h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | 76 | 92 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 54 | 63 | 54 | 63 | | -1 | 9 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B : témoin de non-toxicité du neutralisant | 62 | 67 | 62 | 67 | Na = $\frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$ | | 8,4E+02 | < | 1,4E+02 | < | 1,4E+02 | |
| | 62 | 67 | 62 | 67 | Log N0 = 7,3 | Log Na = | 2,9 | | 2,1 | | 2,1 | |
| C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 50 % | 62 | 67 | 62 | 67 | Calcul de réduction = Log N ₀ - Log Na = Log R | | 4,4 | > | 5,2 | > | 5,2 | |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | | | | | | | | |

Calculs Nv = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml). N₀, A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml).

NvB = $\frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml).

C : somme des valeurs Vc prises en compte n : nombre de boîtes considérées

SUITE A DONNER :
VISA : **Conforme**

Enterococcus hirae - 1 minute

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

Numéro d'identification: **3336 16 05 13727** Date : **31.05.16**
Type de produit testé : Lavage des mains
Méthode utilisée : Classique
Température : Inférieure à 40°C
Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boîte | | | |
|-----------------------------|---------------------------------------|-------------|------------------------|-------------|
| | Dilution -6 | Dilution -7 | Dilution -6 | Dilution -7 |
| Enterococcus hirae CIP 5855 | 171 | 20 | 171 | 20 |
| | 162 | 17 | 162 | 17 |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | |

Numéro d'identification: **3336 16 05 13727**

| | | | | | | | |
|-----|---|-------------------|---|---------|------------------|---------|--------|
| Nv | C | $\frac{740}{2}$ | = | 3,7E+02 | N ₀ = | 3,7E+01 | UFC/mL |
| NvB | C | $\frac{82000}{2}$ | = | 4,1E+04 | | | UFC/mL |
| A | C | $\frac{77}{2}$ | = | 3,9E+01 | | | UFC/mL |
| B | C | $\frac{92}{2}$ | = | 4,6E+01 | | | UFC/mL |
| C | C | $\frac{91}{2}$ | = | 4,6E+01 | | | UFC/mL |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 370
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution 2
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution 2
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte :10⁶
Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{370}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^6} = 1,7E+08$ UFC/ml N₀=N/10⁶ = 1,7E+07

Interprétation :
N est compris entre 1,5.10⁸ UFC/ml et 5.10⁸ UFC/ml 1,7E+08 Oui
Nv est compris entre 3.10² et 1,6.10³ 3,7E+02 Oui
NvB est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 4,1E+04 Oui
Nv0 est compris entre 3.10¹ et 1,6.10² 3,7E+01 Oui
A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 3,9E+01 et 4,6E+01 Oui
B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB 4,6E+01 Oui
La neutralisation est validée : Oui

$$5 < Q = \frac{\text{dil} - 6/2}{\text{dil} - 7/2} < 15 = \frac{166,5}{18,5} = 9,0$$

Essai de validation : Temps de contact : VL 1' Essai : Temps de contact : VL 1'

| | De 14 à 330 UFC par boîte | | De 14 à 330 UFC par boîte | | Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 10 ml de la fiole à 50% | | 50 ml de la fiole à 50% | | 62,5 | | |
|---|---------------------------|----|---------------------------|--|---|--------------|-------------------------|----------------------------------|-------------------------|---------|------|-----|--|
| | | | | | | | | | | | | | |
| Nv : témoin suspension | 38 | 36 | 38 | 36 | Concentration produit % | | 5 | 25 | 50 | | | | |
| NvB : témoin suspension B | 43 | 39 | 43 | 39 | Dénombrement à 20h/24h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 36 | | 36 | | | -1 | 38 | 44 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| A : témoin des conditions expérimentales | 36 | 41 | 36 | 41 | Dénombrement à 40h/48h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 45 | 47 | 45 | 47 | | -1 | 38 | 44 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| B : témoin de non-toxicité du neutralisant | 48 | 43 | 48 | 43 | Na = $\frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$ | | | | | | | | |
| | 43 | | 43 | | Log N0 = 7,2 | Log Na = 3,6 | < | 1,4E+02 | < | 1,4E+02 | | | |
| Calculs Nv = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml). N ₀ , A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml). | | | | Calcul de réduction = Log N ₀ - Log Na = Log R | | | | 3,6 | > | 5,1 | > | 5,1 | |
| NvB = $\frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml). | | | | C : somme des valeurs Vc prises en compte n : nombre de boîtes considérées | | | | SUITE A DONNER : VISA : Conforme | | | | | |

Staphylococcus aureus - 1 minute

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250J
Date : 17/12/15

Numéro d'identification: **3336 16 05 13727** Date : **31.05.16**
Type de produit testé : Lavage des mains
Méthode utilisée : Classique
Température : Inférieure à 40°C
Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boîte | | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|-------------|------------------------|-------------|
| | Dilution -6 | Dilution -7 | Dilution -6 | Dilution -7 |
| Staphylococcus aureus CIP 483 | 163 | 14 | 163 | 14 |
| | 185 | 17 | 185 | 17 |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | |

Numéro d'identification: **3336 16 05 13727**

| | | | | | | | |
|-----|---|-------------------|---|---------|------------------|---------|--------|
| Nv | C | $\frac{940}{2}$ | = | 4,7E+02 | N ₀ = | 4,7E+01 | UFC/mL |
| NvB | C | $\frac{87000}{2}$ | = | 4,4E+04 | | | UFC/mL |
| A | C | $\frac{87}{2}$ | = | 4,4E+01 | | | UFC/mL |
| B | C | $\frac{109}{2}$ | = | 5,5E+01 | | | UFC/mL |
| C | C | $\frac{104}{2}$ | = | 5,2E+01 | | | UFC/mL |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 379
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution 2
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution 2
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte :10⁶
Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{379}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^6} = 1,7E+08$ UFC/ml N₀=N/10⁶ = 1,7E+07

Interprétation :
N est compris entre 1,5.10⁸ UFC/ml et 5.10⁸ UFC/ml 1,7E+08 Oui
Nv est compris entre 3.10² et 1,6.10³ 4,7E+02 Oui
NvB est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 4,4E+04 Oui
Nv0 est compris entre 3.10¹ et 1,6.10² 4,7E+01 Oui
A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 4,4E+01 et 5,2E+01 Oui
B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB 5,5E+01 Oui
La neutralisation est validée : Oui

$$5 < Q = \frac{\text{dil} - 6/2}{\text{dil} - 7/2} < 15 = \frac{174}{15,5} = 11,2$$

Essai de validation : Temps de contact : **VL** **1'** Essai : Temps de contact : **VL** **1'**

| | De 14 à 330 UFC par boîte | | De 14 à 330 UFC par boîte | | Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 10 ml de la fiole à 50% | | 50 ml de la fiole à 50% | | 62,5 | |
|--|---|----|--|----|---|--------------|-------------------------|---------|-------------------------|---------|------|---|
| | | | | | Concentration produit % | | 5 | | 25 | | 50 | |
| Nv : témoin suspension | 45 | 45 | 45 | 45 | Dénombrement à 20h/24h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | 145 | 134 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 49 | 49 | 49 | 49 | | -1 | 12 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| NvB : témoin suspension B | 46 | 46 | 46 | 46 | Dénombrement à 40h/48h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | 145 | 134 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 41 | 41 | 41 | 41 | | -1 | 12 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A : témoin des conditions expérimentales | 42 | 42 | 42 | 42 | | | | | | | | |
| | 45 | 45 | 45 | 45 | | | | | | | | |
| B : témoin de non-toxicité du neutralisant | 56 | 56 | 56 | 56 | | | | | | | | |
| | 53 | 53 | 53 | 53 | | | | | | | | |
| C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 50 % | 50 | 50 | 50 | 50 | | | | | | | | |
| | 54 | 54 | 54 | 54 | | | | | | | | |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | | | | | | | | |
| Calculs | Nv = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml) | | N ₀ , A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml) | | Na = $\frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$ | 1,4E+03 | < | 1,4E+02 | < | 1,4E+02 | | |
| | NvB = $\frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml) | | | | Log N0 = 7,2 | Log Na = 3,1 | | 2,1 | | 2,1 | | |
| | | | | | Calcul de réduction = Log N ₀ - Log Na = Log R | 4,1 | > | 5,1 | > | 5,1 | | |

C : somme des valeurs Vc prises en compte n : nombre de boîtes considérées

SUITE A DONNER :
VISA : **Conforme**

Direction Scientifique

Liste des signataires du document



Nom_utilisateur : Chrystèle Pluchart
Titre : Responsable Laboratoire de Microbiologie
Date : lundi, 27 juin 2016, 18:38 Paris
Signification : Validation de document



Nom_utilisateur : Gaetan Rauwel
Titre : Directeur Recherche et Développement
Date : lundi, 27 juin 2016, 18:53 Paris
Signification : Validation de document

=====
N Demande : 34173
Rapport d'essai : A 16 92 13727

Etude : NF EN 13727

Date du document : 27/06/2016
=====

| | | |
|--|---|---------------------------------------|
|   |  <small>L'ENTE ITALIANO DI ACCREDITAMENTO</small> | Test Report No.: 2011/1546 PROVA |
| | | Version: English |
| | LAB N° 0032 | Page: 1 of 1 |
| | Signatory of EA, IAF and ILAC Mutual Recognition Agreements | Print date: Oct 17 th 2011 |

| | | | |
|------------------------------------|---|-----------------------------|----------------------------|
| TEST REPORT 2011/1546 PROVA | | | |
| SPONSOR: | LABORATORIES ANIOS LILLE | | |
| | Dr DURAND FRANCOISE | | |
| | 59260 HELLEMES | | |
| | PAVÉ DU MOULIN (LILLE) | | |
| REFERENCE/GUIDELINE: | EN12791:2005 – Chemical disinfectants and antiseptics. Surgical hand disinfection. Test method and requirement (phase2/step2) | | |
| TEST SAMPLE | | | |
| IDENTIFICATION | DERMANIOS SCRUB CHLORHEX 4% | | |
| SAMPLE TYPOLOGY | Hand biocide (surgical handwash) | | |
| BATCH N. | 249 60 | FORMULA CODE | // |
| MANUFACTURING DATE | // | EXPIRY DATE | // |
| MANUFACTURER | LABORATORIES ANIOS | | |
| COMPOSITION | Not provided | | |
| SAMPLE ID | 11.2341-S | | |
| RECEIVING N. | EUITVI-19417 | RECEIVING DATE | Sept 09 th 2011 |
| ANALYSIS STARTING DATE | Oct 03 rd 2011 | ANALYSIS ENDING DATE | Oct 12 th 2011 |
| EXPERIMENTAL CONDITIONS | | | |
| TEST TEMPERATURE | 20 - 25°C | | |
| CONCENTRATION | Neat (3 ml for each application) | | |
| FREQUENCY OF APPLICATION | directly on the hands of volunteer; the applications were performed twice each 2.5 minutes | | |
| CONTACT TIME | 5 minutes | | |
| INACTIVATION OF THE PRODUCT | CEN neutralizer: Lecithin 3 g MERCK Polysorbate 80 30 g MERCK Sodium Thiosulfate 5 g MERCK L-histidine 1 g MERCK Saponin 30 g SIGMA Tryptone-treated water (q. s.) to 1000 ml | | |
| RESULTS | See Attachment #1 | | |
| CONCLUSIONS: | BACTERICIDAL in practical use conditions (surgical handwash) after 5 minutes contact time. | | |
| ADDENDA: | - N. 1: RAW DATA (2 pages) | | |

| | | | |
|--|---|------------|---------------------------|
| SENIOR SCIENTIST (LAURA BRAMBILLA) |  | ISSUED ON: | Oct 17 th 2011 |
|--|---|------------|---------------------------|

This certificate may not be reproduced in part unless expressly approved in writing by Eurofins Biolab.
 The test results relate only to the items tested. Sampling, except specific indication on test report, is always intended to be made by the manufacturer.

Characterization of the test sample is under Sponsor responsibility.

Eurofins Biolab S.r.l.
 Società con Socio unico sottoposta a direzione e coordinamento della Eurofins Scientific Italia S.r.l. parte di Eurofins Scientific Group
<http://pharma.eurofins.com/>

Via Bruno Buozzi, 2
 20090 Vimodrone (MI) - Italia
 Tel. + 39-022507151
 Fax + 39-0225071599
 biolab@eurofins.com
www.eurofins.it www.biolab.it

C.SOC. € 100.000 i.v.
 P. IVA 00762140960
 C.F. 03765750157
 REA MI 966696
 D-U-N-S 429117112
 CIT005 4-385

| | |
|---|---|
|  | TRATTAMENTO CHIRURGICO DELLE MANI HANDRUB/HANDWASH (SURGICAL HANDWASH/HANDRUB) |
| Mod. PS/MIC/007.D | Norma (Standard): EN 12791:2005 - phase 2/step 2 |
| Rev.3 | Pagina 1 di 2 (Page 1 of 2) |

Data inizio (Started on):

03/10/11

ID. studio (ID. Study):

2011/1546 PROVA

ID. campione (ID. sample): 11.2341-S

| Vol. code | PREVALUES 1-PROPANOL | | | | POSTVALUES 1-PROPANOL | | | |
|-----------|------------------------------------|------------------------------------|-------------|-------------|-------------------------|-------------------|-------------|-------------|
| | 10 ⁻² DX (cfu/plate) | 10 ⁻² SX (cfu/plate) | LOG(DX) | LOG(SX) | DX (cfu/plate) | SX (cfu/plate) | LOG(DX) | LOG(SX) |
| FEDI316 | 88 | 113 | 3.94 | 4.05 | 1120 | 3200 | 3.05 | 3.51 |
| SAPO213 | 46 | 40 | 3.66 | 3.60 | 740 | 910 | 2.87 | 2.96 |
| DABE206 | 550 | 245 | 4.74 | 4.39 | 4400 | 840 | 3.64 | 2.92 |
| ANES297 | 92 | 68 | 3.96 | 3.83 | 270 | 500 | 2.43 | 2.70 |
| GABA315 | 256 | 281 | 4.41 | 4.45 | 12200 | 4200 | 4.09 | 3.62 |
| LUFIU18 | 142 | 140 | 4.15 | 4.15 | 5500 | 3600 | 3.74 | 3.56 |
| GROCCOZ | 14 | 18 | 3.15 | 3.26 | 864 | 600 | 2.94 | 2.78 |
| CRPO314 | 32 | 40 | 3.51 | 3.60 | 86 | 1000 | 1.93 | 3.00 |
| MAPE312 | 84 | 66 | 3.92 | 3.82 | 13200 | 20000 | 4.12 | 4.30 |
| PACLE56 | 51 | 70 | 3.71 | 3.85 | 9600 | 19400 | 3.98 | 4.29 |
| CIES264 | 1220 | 28 | 5.09 | 3.45 | 8100 | 174 | 3.91 | 2.24 |
| LATA251 | 238 | 108 | 4.38 | 4.03 | 680 | 56 | 2.83 | 1.75 |
| MATR175 | 80 | 105 | 3.90 | 4.02 | 179 | 510 | 2.25 | 2.71 |
| PACA53 | 19 | 63 | 3.28 | 3.80 | 1720 | 21200 | 3.24 | 4.33 |
| FRANTAJ | 20 | 41 | 3.30 | 3.61 | 285 | 181 | 2.45 | 2.26 |
| SIVI134 | 168 | 104 | 4.23 | 4.02 | 2627 | 27800 | 3.42 | 4.44 |
| GIGR221 | 80 | 72 | 3.90 | 3.86 | 125 | 116 | 2.10 | 2.06 |
| DOSA311 | 2 | 28 | 2.30 | 3.45 | 32 | 92 | 1.51 | 1.96 |
| RICPEL57 | 175 | 245 | 4.24 | 4.39 | 6100 | 30000 | 3.79 | 4.48 |
| | MEAN PREVALUES T | | 3.87 | 3.85 | MEAN PREVALUES R | | 3.06 | 3.14 |

VALIDO (VALID)

| Vol. code | PREVALUES TEST SUBSTANCE | | | | POSTVALUES TEST SUBSTANCE | | | |
|-----------|------------------------------------|------------------------------------|-------------|-------------|---------------------------|-------------------|-------------|-------------|
| | 10 ⁻² DX (cfu/plate) | 10 ⁻² SX (cfu/plate) | LOG(DX) | LOG(SX) | DX (cfu/plate) | SX (cfu/plate) | LOG(DX) | LOG(SX) |
| PACLE56 | 56 | 68 | 3.75 | 3.83 | 2018 | 17200 | 3.30 | 4.24 |
| CIES264 | 22 | 70 | 3.34 | 3.85 | 160 | 42 | 2.20 | 1.62 |
| LATA251 | 52 | 48 | 3.72 | 3.68 | 1680 | 3500 | 3.23 | 3.54 |
| MATR175 | 39 | 26 | 3.59 | 3.41 | 400 | 880 | 2.60 | 2.94 |
| PACA53 | 25 | 15 | 3.40 | 3.18 | 310 | 390 | 2.49 | 2.59 |
| FRANTAJ | 51 | 47 | 3.71 | 3.67 | 410 | 800 | 2.61 | 2.90 |
| SIVI134 | 61 | 45 | 3.79 | 3.65 | 520 | 28200 | 2.72 | 4.45 |
| GIGR221 | 680 | 2440 | 4.83 | 5.39 | 3400 | 31 | 3.53 | 1.49 |
| DOSA311 | 47 | 31 | 3.67 | 3.49 | 560 | 27800 | 2.75 | 4.44 |
| RICPEL57 | 100 | 400 | 4.00 | 4.60 | 4000 | 93 | 3.60 | 1.97 |
| FEDI316 | 38 | 96 | 3.58 | 3.98 | 5600 | 8400 | 3.75 | 3.92 |
| SAPO213 | 17 | 29 | 3.23 | 3.46 | 1382 | 1100 | 3.14 | 3.04 |
| DABE206 | 189 | 148 | 4.28 | 4.17 | 27200 | 29 | 4.43 | 1.46 |
| ANES297 | 16 | 20 | 3.20 | 3.30 | 33 | 29 | 1.52 | 1.46 |
| GABA315 | 460 | 410 | 4.66 | 4.61 | 21200 | 28800 | 4.33 | 4.46 |
| LUFIU18 | 280 | 350 | 4.45 | 4.54 | 13600 | 30000 | 4.13 | 4.48 |
| GROCCOZ | 32 | 14 | 3.51 | 3.15 | 175 | 102 | 2.24 | 2.01 |
| CRPO314 | 90 | 80 | 3.95 | 3.90 | 4500 | 13600 | 3.65 | 4.13 |
| MAPE312 | 26 | 88 | 3.41 | 3.94 | 1327 | 440 | 3.12 | 2.64 |
| | 450 | 390 | 4.65 | 4.59 | 29600 | 29000 | 4.47 | 4.46 |
| | MEAN PREVALUES T | | 3.84 | 3.92 | MEAN POSTVALUES T | | 3.19 | 3.11 |

VALIDO (VALID)

Data inizio (Started on): 03/10/11

ID. studio (ID. Study): 2011/1546 PROVA

ID. campione (ID. sample): 11.2341-S

| 1-PROPANOL | | |
|------------|---------------------------|--------------------------|
| 1-PROPANOL | DIFF. PRE-POST (right) | DIFF. PRE-POST (left) |
| FEDI316 | 0.89 | 0.54 |
| SAPO213 | 0.79 | 0.64 |
| DABE206 | 1.10 | 1.47 |
| ANES297 | 1.53 | 1.13 |
| GABA315 | 0.32 | 0.83 |
| LUFIU18 | 0.41 | 0.59 |
| GIUCCO23 | 0.21 | 0.48 |
| CRQUAT14 | 0.66 | 0.41 |
| CRPO314 | 1.58 | 0.60 |
| MAPE312 | -0.20 | -0.48 |
| PACLE56 | -0.27 | -0.44 |
| CIES264 | 1.18 | 1.21 |
| LATA251 | 1.55 | 2.28 |
| MATR175 | 1.65 | 1.31 |
| PACA53 | 0.04 | -0.53 |
| FRANTA52 | 0.85 | 1.35 |
| SIVI134 | 0.81 | -0.42 |
| GIGR221 | 1.80 | 1.80 |
| DOSA311 | 0.79 | 1.49 |
| RICPEL57 | 0.45 | -0.09 |
| | 0.81 | 0.71 |

| TEST SUBSTANCE | | |
|----------------|---------------------------|--------------------------|
| Vol. code | DIFF. PRE-POST (right) | DIFF. PRE-POST (left) |
| PACLE56 | 0.45 | -0.41 |
| CIES264 | 1.14 | 2.23 |
| LATA251 | 0.49 | 0.14 |
| MATR175 | 0.99 | 0.47 |
| PACA53 | 0.91 | 0.59 |
| FRANTA52 | 1.10 | 0.77 |
| SIVI134 | 1.07 | -0.80 |
| GIGR221 | 1.30 | 3.90 |
| DOSA311 | 0.92 | -0.95 |
| RICPEL57 | 0.40 | 2.63 |
| FEDI316 | -0.17 | 0.06 |
| SAPO213 | 0.09 | 0.42 |
| DABE206 | -0.15 | 2.71 |
| ANES297 | 1.68 | 1.84 |
| GABA315 | 0.33 | 0.15 |
| LUFIU18 | 0.32 | 0.06 |
| GIUCCO23 | 1.27 | 1.14 |
| CRQUAT14 | 0.30 | -0.23 |
| CRPO314 | 0.29 | 1.30 |
| MAPE312 | 0.18 | 0.13 |
| | 0.65 | 0.81 |

| Vol. code | DIFF. REF-TEST (right) | DIFF. REF-TEST (left) |
|-----------|---------------------------|--------------------------|
| FEDI316 | 1.06 | 0.48 |
| SAPO213 | 0.70 | 0.22 |
| DABE206 | 1.25 | -1.24 |
| ANES297 | -0.15 | -0.71 |
| GABA315 | -0.01 | 0.68 |
| LUFIU18 | 0.09 | 0.53 |
| GIUCCO23 | -1.06 | -0.66 |
| CRQUAT14 | 0.36 | 0.64 |
| CRPO314 | 1.29 | -0.70 |
| MAPE312 | -0.38 | -0.61 |
| PACLE56 | -0.72 | -0.03 |
| CIES264 | 0.04 | -1.02 |
| LATA251 | 1.06 | 2.14 |
| MATR175 | 0.66 | 0.84 |
| PACA53 | -0.87 | -1.12 |
| FRANTA52 | -0.25 | 0.58 |
| SIVI134 | -0.26 | 0.38 |
| GIGR221 | 0.50 | -2.10 |
| DOSA311 | -0.13 | 2.44 |
| RICPEL57 | 0.05 | -2.72 |
| | 0.16 | -0.10 |

| Vol. code | RANKS | |
|--------------|----------------|--------------|
| | immediate test | 3 hours test |
| FEDI316 | 17 | 4 |
| SAPO213 | 13 | 2 |
| DABE206 | 19 | -16 |
| ANES297 | -6 | -12 |
| GABA315 | -1 | 10 |
| LUFIU18 | 4 | 5 |
| GIUCCO23 | -17 | -9 |
| CRQUAT14 | 9 | 8 |
| CRPO314 | 20 | -11 |
| MAPE312 | -10 | -7 |
| PACLE56 | -14 | -1 |
| CIES264 | 2 | -14 |
| LATA251 | 17 | 18 |
| MATR175 | 12 | 13 |
| PACA53 | -15 | -15 |
| FRANTA52 | -7 | 6 |
| SIVI134 | -8 | 3 |
| GIGR221 | 11 | -17 |
| DOSA311 | -5 | 19 |
| RICPEL57 | 3 | -20 |
| SUM + | 127 | 88 |
| SUM - | -83 | -122 |

CONCLUSIONE (CONCLUSION)

 CONFORME
(CONFORM)

 CONFORME
(CONFORM)

Sigla tecnico (Technician signature):

Data fine (Finished on):

12/10/11

Sigla Approvazione (Approval signature):

Data (Date):

12/10/11



HYGIENE NORD GMBH, c/o BIOTECHNIKUM, W.-RATHENAU-STR. 49 A, D-17489 GREIFSWALD

Laboratoires ANIOS

Pavè du Moulin

59260 Lille-Hellemmes

CUSTOMER NUMBER

314

DATE

December 20, 2016

REPORT A 16372-2

FORMULA 2173

YEASTICIDAL EFFICACY (EN 13624)

Purpose

The yeasticidal activity of **Formula 2173** as a surgical and hygienic handwash disinfectant (Laboratoires ANIOS, Lille-Hellemmes, France) should be evaluated in accordance with the European Standard EN 13624 (2013).

Test description

| | |
|--------------------------|---|
| Manufacturer: | Laboratoires ANIOS, Lille-Hellemmes, Lyon, France |
| Product name: | Formula 2173 |
| Batch number: | U28101 |
| Sample number: | P 165949 |
| Date of manufacture: | 10/2016 |
| Best before: | 10/2019 |
| Date of order: | October 20, 2016 |
| Date of delivery: | October 27, 2016 |
| Test date: | December 16, 2016 – December 19, 2016 |
| Basis: | EN 13624 (2013): Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal and yeasticidal activity in the medical area – test method and requirements (phase 2, step 1) |
| Test organisms: | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 |
| Test solution: | 97 %, 80 % 50 %, 5 % |
| Active ingredients: | 40 mg/g chlorhexidine digluconate |
| Odour: | fresh and sweetish |
| Appearance: | pink liquid |
| Appearance of dilutions: | slightly pink liquids |
| pH – value (pH-meter): | 100 %: 5.40 50 %: 5.62 5 %: 7.07 WSH: 7.20 |
| Neutralizer: | 4 % Tween80 + 3 % Saponin + 2 % Histidin + 0.4 % Lecthin + 0.5 % SDS (Neutralizer XXXII) |
| Interfering substance: | 0.3 % albumin + 0.3 % sheep erythrocytes (dirty conditions) |
| Test temperature: | 20 ± 1 °C |
| Incubation temperature: | 30 ± 1 °C |

Test Method

Quantitative suspension test

Testing is based on the European Standard EN 13624 (2013). Validation and control procedures are therefore carried out in accordance with that standard.

A sample of the product **Formula 2173** (diluted with hard water, if necessary) is added to a suspension of test organisms in a solution of the interfering substance. The mixture is maintained at 20 ± 1 °C for the required contact times. At the end of the contact time, an aliquot of 1 ml is taken; the fungicidal activity in this portion is immediately neutralized. Two 1 ml samples (per dilution step) of this suspension are spread on at least 2 plates each. The number of surviving test organisms in the test mixture is calculated for each sample and the reduction is determined with respect to the corresponding test suspension N_0 .

The experimental conditions (control A), the non-toxicity of the neutralizer (control B) and the dilution-neutralization method (control C) are validated.

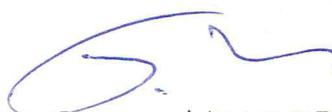
The test is performed under dirty conditions (0.3 % albumin + 0.3 % sheep erythrocytes) only using *C. albicans* as test organism. Results are presented in table 1.

Results

According to the EN 13624 (2013), the batch U28101 of the product **Formula 2173**, applied at a concentration of at least 5 %, possesses yeasticidal efficacy ($\log_{10} RF \geq 2$, for handwash products) in 30 s under **dirty conditions** at 20 °C for reference strain *C. albicans* (table 1).

Results are validated in accordance with the requirements of the EN 13624 (2013).

Greifswald, December 20, 2016


Dr. rer. med. (Dipl. Biol.) T. Koburger-Janssen
- General Manager -


AKKREDITIERTES PRÜFLABOR
DIN EN ISO/IEC 17025
DAKKS PL 1841
HYGIENE NORD GMBH
W.-RATHENAU-STR. 49A
17489 GREIFSWALD
Prof. Dr. med. A. Kramer
- MD for Hygiene and Environmental Medicine -

Table 1: Results of the quantitative suspension test following the EN 13624 (2013)

| | | | |
|---|--|-------------------|-----------|
| Date: | December 19, 2016 | Order number: | A 16372 |
| Product: | Formula 2173 | Sample number: | P 165949 |
| Test organism: | <i>C. albicans</i> | Lot number: | U28101 |
| Interfering substance: | 0.3 % albumin + 0.3 % sheep erythrocytes | | |
| Incubation temperature: | 30 ± 1 °C | Neutralizer: | XXXII |
| Test suspension (N ₀): | 2.59*10 ⁶ cfu/ml (6.41 log) | Incubation time: | 48 h |
| Validation suspension (N _v): | 8.05*10 ² cfu/ml (2.91 log) | Test temperature: | 20 ± 1 °C |
| Validation suspension (N _{vb}): | 9.30*10 ⁴ cfu/ml (4.97 log) | | |

| contact time: 30 s | | | | | | | | | |
|--------------------|--------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|----------------------|---------------------|
| concentration | dilution | cfu / plate 1 | cfu / plate 2 | cfu / plate 3 | cfu / plate 4 | V _{c1} | V _{c2} | log ₁₀ Na | log ₁₀ R |
| 97 % | 1 ml (10 ⁰) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | < 2.15 | > 4.27 |
| | 1 ml (10 ⁻¹) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |
| | 1 ml (10 ⁻²) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |
| 80 % | 1 ml (10 ⁰) | 1 | 0 | 1 | 0 | < 14 | < 14 | < 2.15 | > 4.27 |
| | 1 ml (10 ⁻¹) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |
| | 1 ml (10 ⁻²) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |
| 50 % | 1 ml (10 ⁰) | 2 | 2 | 4 | 3 | < 14 | < 14 | < 2.15 | > 4.27 |
| | 1 ml (10 ⁻¹) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |
| | 1 ml (10 ⁻²) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |
| 5 % | 1 ml (10 ⁰) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | < 2.15 | > 4.27 |
| | 1 ml (10 ⁻¹) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |
| | 1 ml (10 ⁻²) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |
| 1 % | 1 ml (10 ⁰) | > 330 | > 330 | > 330 | > 330 | > 660 | > 660 | | |
| | 1 ml (10 ⁻¹) | > 330 | > 330 | > 330 | > 330 | > 660 | > 660 | | |
| | 1 ml (10 ⁻²) | > 330 | > 330 | > 330 | > 330 | ≥ 660 | ≥ 660 | > 5.82 | < 0.59 |

| contact time: 60 s | | | | | | | | | |
|--------------------|--------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|----------------------|---------------------|
| concentration | dilution | cfu / plate 1 | cfu / plate 2 | cfu / plate 3 | cfu / plate 4 | V _{c1} | V _{c2} | log ₁₀ Na | log ₁₀ R |
| 97 % | 1 ml (10 ⁰) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | < 2.15 | > 4.27 |
| | 1 ml (10 ⁻¹) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |
| | 1 ml (10 ⁻²) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |
| 80 % | 1 ml (10 ⁰) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | < 2.15 | > 4.27 |
| | 1 ml (10 ⁻¹) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |
| | 1 ml (10 ⁻²) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |
| 50 % | 1 ml (10 ⁰) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | < 2.15 | > 4.27 |
| | 1 ml (10 ⁻¹) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |
| | 1 ml (10 ⁻²) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |
| 5 % | 1 ml (10 ⁰) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | < 2.15 | > 4.27 |
| | 1 ml (10 ⁻¹) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |
| | 1 ml (10 ⁻²) | 0 | 0 | 0 | 0 | < 14 | < 14 | | |

Table 1, continued: Results of the quantitative suspension test following the EN 13624 (2013)

Date: December 19, 2016 Order number: A 16372
 Product: Formula 2173 Sample number: P 165949
 Test organism: *C. albicans* Lot number: U28101
 Interfering substance: 0.3 % albumin + 0.3 % sheep erythrocytes
 Incubation temperature: 30 ± 1 °C Neutralizer: XXXII
 Test suspension (N₀): 2.59*10⁶ cfu/ml (6.41 log) Incubation time: 48 h
 Validation suspension (N_v): 8.05*10² cfu/ml (2.91 log) Test temperature: 20 ± 1 °C
 Validation suspension (N_{vB}): 9.30*10⁴ cfu/ml (4.97 log)

| Validation - Suspension (N _{vo}) | | | | Experimental condition control (A) | | | | Neutralizer control (B) | | | | Method validation (C); Product concentration: 97 % | | | | | | | |
|---|----|----------------|-----------|---|-----------------|----------------|-----------|---|----|-----------------|-----------|---|-----|----------------|-----------------|----|----|-----|-------|
| cfu / plate 1 & 2 | | V _c | \bar{x} | cfu / plate 1 & 2 | | V _c | \bar{x} | cfu / plate 1 & 2 | | V _c | \bar{x} | cfu / plate 1 & 2 | | V _c | \bar{x} | | | | |
| V _{c1} | 36 | 46 | 82 | 80.5 | V _{c1} | 43 | 42 | 85 | 86 | V _{c1} | 59 | 49 | 108 | 110 | V _{c1} | 79 | 57 | 136 | 120.5 |
| V _{c2} | 40 | 39 | 79 | | V _{c2} | 47 | 40 | 47 | | V _{c2} | 59 | 53 | 112 | | V _{c2} | 53 | 52 | 105 | |
| 30 ≤ \bar{x} of N _{vo} ≤ 160? | | | | \bar{x} of A is ≥ 0.5 \bar{x} of N _{vo} ? | | | | \bar{x} of B is ≥ 0.0005 \bar{x} of N _{vB} ? | | | | \bar{x} of C is ≥ 0.5 \bar{x} of N _{vo} ? | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no | | | | <input checked="" type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no | | | | <input checked="" type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no | | | | <input checked="" type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no | | | | | | | |
| Method validation (C); Product concentration: 80 % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| cfu / plate 1 & 2 | | V _c | \bar{x} | | | | | | | | | | | | | | | | |
| V _{c1} | 44 | 51 | 95 | 96.5 | | | | | | | | | | | | | | | |
| V _{c2} | 50 | 48 | 98 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| \bar{x} of C is ≥ 0.5 \bar{x} of N _{vo} ? | | | | <input checked="" type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no | | | | | | | | | | | | | | | |
| Method validation (C); Product concentration: 50 % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| cfu / plate 1 & 2 | | V _c | \bar{x} | | | | | | | | | | | | | | | | |
| V _{c1} | 46 | 37 | 83 | 92.5 | | | | | | | | | | | | | | | |
| V _{c2} | 50 | 52 | 102 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| \bar{x} of C is ≥ 0.5 \bar{x} of N _{vo} ? | | | | <input checked="" type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no | | | | | | | | | | | | | | | |

Legend:

| | | |
|-----------|---|--------------------------------|
| MW | = | average value |
| x | = | average value |
| \bar{x} | = | average value |
| RF | = | reduction factor |
| R | = | reduction factor |
| > 165 | = | not countable |
| > 330 | = | not countable |
| > 660 | = | not countable |
| n.d. | = | not determined |
| WSH | = | water of standardized hardness |

Sainghin en Mélantois, le 27 juin 2016

Sainghin en Mélantois, on the June 27th 2016

Rapport d'essai : N° A 16 90 13624

Test report : N° A 16 90 13624

1. Objet de la demande (Study Number) n° 34171

Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité levuricide de la formule **2173**. Méthode d'essai et prescriptions (phase 2 - étape 1) NF EN 13624 (Novembre 2013). Application aux désinfectants chimiques pour le lavage chirurgical des mains.

Indice de classement T 72-600.

Méthode par dilution neutralisation.

*Chemical antiseptics and disinfectants. Quantitative suspension test for the evaluation of the yeasticidal activity of the formula **2173**. Test method and prescriptions (phase 2 - step 1) according to NF EN 13624 (November 2013). Application to chemical disinfectants for the surgical handwash. Classification index T 72-600.*

Method by dilution neutralisation.

Ce rapport d'essai ne concerne que le produit (cité ci après) soumis à l'essai.

This trial report concerns only the product (quoted this later) subjected on approval

Ce document comporte 8 pages numérotées dont 1 annexe de 1 page

This report is made of 8 numbered pages including 1 annex of 1 page

La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous la forme de fac- similé photographique intégral. Seule la version électronique fait foi.

*The reproduction of this trial report is authorized only under the shape of complete photographic reproduction
Only the electronic version is valid.*

2. Sommaire (Summary)

| | |
|---|---|
| 1. Objet de la demande (<i>Study Number</i>) n° 34171 | 1 |
| 2. Sommaire (<i>Summary</i>) | 2 |
| 3. Introduction (<i>Introduction</i>) | 3 |
| 4. Identification de l'échantillon (<i>Sample Identification</i>) | 3 |
| 5. Méthode expérimentale (<i>Experimental Method</i>) | 4 |
| 5.1. Conditions expérimentales (<i>Experimental conditions</i>) | 4 |
| 5.2. Méthode par dilution neutralisation (<i>Method by dilution neutralisation</i>) | 4 |
| 6. Résultats (<i>Results</i>) | 5 |
| 6.1. Essais de validation des conditions expérimentales (<i>Validation tests</i>) | 5 |
| 6.2. Essais d'activité levuricide (<i>Evaluation of yeasticidal activity</i>) | 6 |
| 7. Conclusion (Conclusion) | 6 |
| 8. Annexe - Données expérimentales (Experimental Data) | 7 |

3. Introduction (*Introduction*)

L'essai a été réalisé selon la méthode d'essai décrite dans la norme européenne EN 13624 « Désinfectants chimiques et antiseptiques- Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide en médecine (phase 2 /Etape 1) » .

Détermination de l'activité levuricide dans les conditions de laboratoire définies par la présente norme européenne .

The test was realised according to the test method described in the European standard EN 13624 « Chemical disinfectants and antiseptics- Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal in the medical area».

Determination of the yeasticidal activity in the laboratory conditions defined in the present European standard .

4. Identification de l'échantillon (*Sample Identification*)

| | |
|---|--|
| Code formule | 2173 |
| <i>Code formula</i> | |
| Numéro d'identification de l'échantillon | 3236 16 05 13624 |
| <i>Identification of the sample</i> | |
| Numéro de lot | U132.04 |
| <i>Batch number</i> | |
| Fabricant | Laboratoires ANIOS |
| <i>Manufacturer</i> | |
| Date de réception au laboratoire | Le 25/05/16 |
| <i>Receipt date at the laboratory</i> | <i>On the 25/05/16</i> |
| Conditions de stockage au laboratoire | T° ambiante et obscurité |
| <i>Storage conditions at the laboratory</i> | <i>Room temperature and darkness</i> |
| Substances actives | Digluconate de Chlorhexidine (CAS : 18472-51-0) : 40mg/g |
| <i>Activ substances</i> | <i>Chlorhexidine digluconate (CAS : 18472-51-0) : 40mg/g</i> |
| Période d'essai | Du 25/05/16 au 27/05/16 |
| <i>Period of analysis</i> | <i>From 25/05/16 to 27/05/16</i> |

5. Méthode expérimentale (Experimental Method)

5.1. Conditions expérimentales (Experimental conditions)

| | |
|---|---|
| Température de l'essai <i>Test temperature</i> | 20°C ± 1°C |
| Temps de contact <i>Contact Time</i> | 2 minutes ± 10s |
| Diluant de la formule lors des essais <i>Diluent of the formula used during the test</i> | Eau dure <i>Hard water</i> |
| Apparence de la formule et de ses dilutions <i>Appearance formula dilutions</i> | Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai <i>Preparation physically homogeneous and stable during test</i> |
| Souche testée <i>Tested strain</i> | ○ Candida albicans DSM 1386 |
| Pourcentage de spores échinulées <i>Spiny spores percentage</i> | Non concerné <i>Not concerned</i> |
| Substance interférente <i>Interfering substance</i> | Albumine bovine à 3g/l + 3ml/l érythrocytes <i>3 g/l BSA + 3ml/l erythrocytes</i> |
| Stabilité du mélange formule et substances interférentes <i>Stability of the mixture (formula and interfering substance)</i> | Absence de précipité pendant l'essai <i>Precipitate absent throughout the test</i> |
| Température d'incubation <i>Incubation temperature</i> | 30°C ± 1°C 30°C ± 1°C |

5.2. Méthode par dilution neutralisation (Method by dilution neutralisation)

| | |
|--|---|
| Nature du neutralisant utilisé <i>Nature of the neutralizer agent used</i> | ○ Formule : F010 ○ <i>Formula : F010</i> |
| Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement <i>Neutralizer agent added to the counting medium</i> | 10% 10% |

6. Résultats (Results)

6.1. Essais de validation des conditions expérimentales (Validation tests)

Vérification de la méthodologie et validation de la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **50%** de la formule **2173** soumise à l'essai.

*Checking of the method and validation of the method by dilution neutralisation for the **50%** test concentration of the formula **2173** to be tested.*

| | Nombre de cellules viables (UFC/ml) (Number of viable cells(CFU/ml)) | | | | | | | |
|-------------------------|--|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--|
| Souche testée | Suspension d'essai | Suspension d'essai / 10 | Suspension de validation | Suspension de validation / 10 | Suspension de validation B | Validation conditions expérimentales | Non toxicité du neutralisant | Inactivation par dilution neutralisation |
| Tested strain | Test suspension | Test suspension / 10 | Validation suspension | Validation suspension / 10 | Validation suspension B | Experimental conditions control | Neutralizer toxicity control | Dilution neutralization control |
| | N | N ₀ | N _v | N _{v0} | N _{vB} | A | B | C |
| Candida albicans | 1,5.10 ⁷ | 1,5.10 ⁶ | 3,2.10 ² | 3,2.10 ¹ | 3,7.10 ⁴ | 3,3.10 ¹ | 3,7.10 ¹ | 4,0.10 ¹ |

Pour la souche soumise à l'essai - For the tested strain.

N est compris entre 1,5 x 10⁷ UFC/ml et 5 x 10⁷ UFC/ml
is comprised between 1.5 x 10⁷ CFU/ml and 5 x 10⁷ CFU/ml

N₀ est compris entre 1,5 x 10⁶ UFC/ml et 5 x 10⁶ UFC/ml
is comprised between 1.5 x 10⁶ CFU/ml and 5 x 10⁶ CFU/ml

N_v est compris entre 3 x 10² UFC/ml et 1.6 x 10³ UFC/ml
is comprised between 3 x 10² CFU/ml and 1.6 x 10³ CFU/ml

N_{v0} est compris entre 3 x 10¹ UFC/ml et 1.6 x 10² UFC/ml
is comprised between 3 x 10¹ CFU/ml and 1.6 x 10² CFU/ml

N_{vB} est compris entre 3 x 10⁴ UFC/ml et 1.6 x 10⁵ UFC/ml
is comprised between 3 x 10⁴ CFU/ml and 1.6 x 10⁵ CFU/ml

B est supérieur ou égal à 0,0005 x N_{vB}
are higher or equal to 0,0005 x N_{vB}

A,C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x N_{v0}
are higher or equal to 0.5 x N_{v0}

La neutralisation est validée avec la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **50%** de la formule **2173** et pour la souche soumise à l'essai.

The neutralization is validated with the method by dilution neutralisation for the **50%** test concentration of the formula **2173** and for the tested strain.

6.2. Essais d'activité levuricide (*Evaluation of yeasticidal activity*)

| Souche testée | Nombre de cellules viables (UFC/ml) pour le mélange d'essai (Na) pour les concentrations de : %(v/v) | | |
|-------------------------|--|------------|-------------|
| Tested strain | Number of the viable cells (CFU/ml) for the test mixture (Na) for the concentrations of : %(v/v) | | |
| | 5 | 25 | 50 |
| Candida albicans | $>3,3.10^5$ | $1,2.10^3$ | $<1,4.10^2$ |

| | Réduction du nombre de cellule viables à la concentration d'essai. R = Log N0 - Log Na | | |
|-------------------------|---|-----|------------|
| | Reduction of the number of viable cells at the test concentration. R = Log N0 - Log Na | | |
| | 5 | 25 | 50 |
| Candida albicans | $< 0,7$ | 3,1 | $\geq 4,1$ |

7. Conclusion (Conclusion)

Selon la norme NF EN 13624 (novembre 2013), la formule **2173**, lorsqu'elle est diluée à la concentration de 50,00 % (v/v) dans de l'eau dure, présente une activité levuricide en 2 minutes de contact à 20°C en conditions de saleté , vis-à-vis de la souche de référence pour le lavage chirurgical des mains : **Candida albicans**.

According to the European standard NF EN 13624 (november 2013), the formula **2173** ,when diluted at the concentration of 50.00% (v/v) in hard water, presents a yeasticidal activity in a 2 minute contact time at 20°C in dirty conditions against the referenced strain for the surgical handwash : **Candida albicans**.

8. Annexe - Données expérimentales (Experimental Data)

Candida albicans - 2 minutes

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME EN 13624 méthode par
dilution-neutralisation Novembre 2013

Réf : FS311E
Date : 12/10/15

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME EN 13624 méthode par
dilution-neutralisation Novembre 2013

Réf : FS311E
Date : 12/10/15

Numéro d'identification: **3236 16 05 13624**
Type de produit testé : Lavage des mains
Méthode utilisée : Classique

Date : **25.05.16**

Numéro d'identification: **3236 16 05 13624**

Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC/boîte | | | |
|---------------------------|--------------------------------------|-------------|------------------------|-------------|
| | Dilution -5 | Dilution -6 | Dilution -5 | Dilution -6 |
| Candida albicans DSM 1386 | 148 | 15 | 118 | 15 |
| | 152 | 14 | 185 | 14 |
| | Lecture intermédiaire 20 à 24 heures | | Lecture 42 à 48 heures | |

| | | | | | | | |
|-----|---|-------------------|---|---------|------------------|---------|--------|
| Nv | C | $\frac{640}{2}$ | = | 3,2E+02 | N ₀ = | 3,2E+01 | UFC/mL |
| NvB | C | $\frac{73000}{2}$ | = | 3,7E+04 | | | UFC/mL |
| A | C | $\frac{66}{2}$ | = | 3,3E+01 | | | UFC/mL |
| B | C | $\frac{73}{2}$ | = | 3,7E+01 | | | UFC/mL |
| C | C | $\frac{79}{2}$ | = | 4,0E+01 | | | UFC/mL |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 332
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution 2
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution 2
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte :10⁵
Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{332}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^5} = 1,5E+07$ UFC/ml N₀=N₁₀= 1,5E+06

Interprétation :

N est compris entre 1,5.10⁷ UFC/ml et 5.10⁷ UFC/ml 1,5E+07 Oui
Nv est compris entre 3.10² et 1,6.10³ 3,2E+02 Oui
NvB est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 3,7E+04 Oui
Nv0 est compris entre 3.10¹ et 1,6.10² 3,2E+01 Oui
A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 3,3E+01 et 4,0E+01 Oui
B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB 3,7E+01 Oui

La neutralisation est validée : Oui

$$5 < Q = \frac{\bullet \text{ dil} - 5 / 2}{\bullet \text{ dil} - 6 / 2} < 15 = \frac{151,5}{14,5} = 10,4$$

Essai de validation :

Temps de contact : **VD 2'**

Essai :

Temps de contact : **VD 2'**

| | 14 à 330 UFC/boîte | | 14 à 330 UFC/boîte | | Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 6,25 | | 31,25 | | 62,5 | |
|--|--|----|---|----|--|----------|---------|---|---------|-----|---------|---|
| | | | | | Concentration produit % | | 5 | | 25 | | 50 | |
| Nv : témoin suspension | 31 | 33 | 31 | 33 | Lecture intermédiaire 20 à 24 heures de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | 120 | 122 | 0 | 0 |
| NvB : témoin suspension B | 37 | 36 | 37 | 36 | | -1 | + | + | 10 | 12 | 0 | 0 |
| A : témoin des conditions expérimentales | 25 | 41 | 25 | 41 | | -2 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B : témoin de non-toxicité du neutralisant | 34 | 39 | 34 | 39 | Lecture 42 à 48 heures de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | 120 | 122 | 0 | 0 |
| C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 50 % | 37 | 42 | 37 | 42 | | -1 | + | + | 10 | 12 | 0 | 0 |
| | | | | | | -2 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Lecture intermédiaire 20 à 24 heures | | Lecture 42 à 48 heures | | | | | | | | | |
| Calculs | Nv = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml). | | N ₀ , A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml). | | Na = $\frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$ | > | 3,3E+05 | | 1,2E+03 | < | 1,4E+02 | |
| | NvB = $\frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml). | | | | Log N0 = 6,2 | Log Na = | 5,5 | | 3,1 | | 2,1 | |
| | | | | | Calcul de réduction = Log N ₀ - Log Na = Log R | < | 0,7 | | 3,1 | > | 4,1 | |

C : somme des valeurs Vc prises en compte n : nombre de boîtes considérées

SUITE A DONNER :

VISA : **Conforme**

Direction Scientifique

Liste des signataires du document



Nom_utilisateur : Gaetan Rauwel
Titre : Directeur Recherche et Développement
Date : lundi, 27 juin 2016, 18:53 Paris
Signification : Validation de document



Nom_utilisateur : Chrystèle Pluchart
Titre : Responsable Laboratoire de Microbiologie
Date : mardi, 28 juin 2016, 09:16 Paris
Signification : Validation de document

N Demande : 34171
Rapport d'essai : A 16 90 13624
Etude : NF EN 13624
Date du document : 27/06/2016

Laboratoire de Virologie – UPRES EA3610
CHRU de Lille – Université de Lille 2
Institut Hippocrate, Parc Eurasanté
152 rue du Dr Yersin
59120 Loos lez Lille
France
Tel : (33) 03.20.44.66.88/48.93/69.30
Fax : (33) 03.20.44.48.95
Email : didier.hober@chru-lille.fr

N° de rapport : 2014/31282
Date d'édition : 10/06/2014

**RAPPORT D'ESSAI
DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE
DU PRODUIT DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%**

**Selon la Norme NF EN 14476 (Septembre 2013)
Vis à vis du Virus de l'Immunodéficience Humaine 1 (VIH1)**

**EVALUATION OF THE
VIRUCIDAL EFFECT OF
DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%**

**Test method according to the standard NF EN 14476 (September 2013)
Against Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV1)**

Rapport pour / Report submitted to:

**LABORATOIRES ANIOS
Pavé du moulin
59260 Lille Hellemmes
France**

Ce rapport d'essai ne concerne que le produit (cité ci-après) soumis à l'essai.
This trial report concerns only the product (quoted this later) subjected on approval

Ce document comporte 11 pages numérotées et 3 annexes
This report is made of 11 numbered pages and 3 annexes

La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous la forme de fac-simile photographique
intégral

The reproduction of this trial report is authorized only under the shape of complete photographic reproduction

I- Introduction / Introduction

A la demande de la société ANIOS, le désinfectant **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** a été évalué pour ses propriétés inactivatrices vis-à-vis du Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH1). L'essai a été effectué selon la norme NF EN 14476 : Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide dans le domaine médical – Méthode d'essai et prescriptions (Phase 2/ Etape 1) – Septembre 2013.

*As requested by the ANIOS Society, the **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** disinfectant was evaluated for its virucidal inactivating properties against Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV1). The testing was carried out in accordance with the standard of NF EN 14476: Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area - Test method and requirements (Phase 2/ Step 1) – September 2013.*

II- Identification du produit / Identification of sample

- Nom du produit / *Name of the product* : Dermanios Scrub Chlorhexidine 4%
- Fabricant / *Manufacturer* : Laboratoires ANIOS
- N° de lot – N° de formule / *Lot N° - Formula N°* : R02109
- Date de réception / *Date of receipt* : 04/2014
- Application / *Use* : Nettoyage et désinfection des mains / *Washing and disinfection of hands*
- Aspect du produit / *Appearance of product* : Liquide limpide et rose / *Clear and pink liquid*
- pH du produit / *pH Value* : Non Dilué (20°C) pH=5,40 / *Undiluted (20°C) pH=5.40*
- Conditions de stockage / *Conditions of storage* : Température ambiante, à l'abri de la lumière / *Room temperature in the dark*

III- Conditions expérimentales / Experimental conditions

- Période d'essai / *Period of analysis* : du 14/04/14 au 03/06/14 / *Through 14/04/14 to 03/06/14*
- Température d'essai / *Test temperature* : 20°C +/- 1°C
- Concentrations en produit testées / *Concentration of test product* : 80%, 50%, 5% et / *and 0.1%*
- Temps de contact / *Contact times* : 30 secondes / *seconds, 1.5 et / and 3 minutes*
- Diluant du produit / *Diluent of product* : Eau pour préparation injectable / *Water for injection*
- Substances interférentes / *Interfering substances* : Solution de sérum albumine bovine sérique (SAB) et hématies de mouton à la concentration finale dans l'essai de 3 g de SAB et 3 ml d'hématies de mouton par litre / *Bovine serum albumin (BSA) and sheep erythrocytes at final concentration of 3 g of BSA and 3 ml of sheep erythrocytes per liter in test*
- Méthode pour stopper l'activité du produit / *Procedure to inactivate the product* : Gel filtration

IV- Matériel et Méthodes / Material and methods

1- Matériel / Material

a) Virus / Virus

La souche HTLVIII du Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH1) a été fournie par l'Institut Pasteur de Lille, France. Le titre infectieux du surnageant évalué par mesure de l'infectivité pour la lignée continue MT4 est de $10^{7,50}$ DICT₅₀/ml après 2 semaines de culture.

The HTLVIII strain of the Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV1) was obtained from the Pasteur Institute of Lille, France. The infectious titer of the supernatant evaluated by measuring the infectivity to the MT4 cell line is $10^{7,50}$ TCID₅₀/ml after 2 weeks of culture.

b) Lignée cellulaire / Cell line

La lignée de lymphocytes T humains MT4 utilisée avec le Virus de l'Immunodéficience Humaine a été fournie par le Laboratoire de Virologie du CERVI, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France (Pr Henri Agut).

The human T lymphocytes MT4 cell line used with The Human Immunodeficiency Virus was obtained from the Laboratory of Virology of CERVI, Pitie-Salpetriere hospital, Paris, France (Pr Henri Agut).

2- Méthodes d'essai / Methods

a) Détermination de la concentration subcytotoxique du produit / Determination of cytotoxicity of the product

Les solutions d'essai du produit additionnées de $1/10^{\text{ème}}$ de la substance interférente et de $1/10^{\text{ème}}$ d'eau pour préparation injectable sont diluées de 10^{-1} à 10^{-5} dans du milieu de culture glacé. 0,1 ml de chaque dilution est distribué dans 4 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant 0,1 ml de cellules MT4. La plaque de microtitration est incubée à 37°C en présence de 5% de CO₂ et l'effet subcytotoxique est apprécié après 7 jours de culture.

For determination of cytotoxicity of the disinfectant solutions, 8 parts by volume of solutions of disinfectant mixed with 1 part of interfering substance and 1 part by volume of water for injection were diluted from 10^{-1} to 10^{-5} with ice-cold culture medium. 0.1 ml of each dilution was transferred, into 4 wells of a 96 wells microtitre plate with 0.1 ml of MT4 cells. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere and the cytotoxic effect was read after incubation during 7 days.

b) Elimination de la cytotoxicité du produit / Elimination of cytotoxicity

0,1ml des solutions d'essai du produit additionnées de $1/10^{\text{ème}}$ de la substance interférente et de $1/10^{\text{ème}}$ d'eau pour préparation injectable, sont filtrées sur colonne Microspin S-400 HR (GE Healthcare). Les filtrats sont ensuite dilués de 10^{-1} à 10^{-3} dans du milieu de culture glacé. 0,1 ml de chaque dilution est distribué dans 4 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant 0,1 ml de cellules MT4. La plaque de microtitration est

incubée à 37°C en présence de 5% de CO₂ et l'effet subcytotoxique est apprécié après 7 jours de culture.

For elimination of cytotoxicity of the disinfectant solutions, 0.1 ml of 8 parts by volume of solutions of disinfectant mixed with 1 part of interfering substance and 1 part by volume of water for injection, were filtrated on Microspin S-400 HR column (GE Healthcare). Then filtrates were diluted from 10⁻¹ to 10⁻³ with ice-cold culture medium. 0.1 ml of each dilution was transferred, into 4 wells of a 96 wells microtitre plate with 0.1 ml of MT4 cells. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere and the cytotoxic effect was read after incubation during 7 days.

c) Sensibilité des cellules au virus / *Cell sensitivity to virus*

Un titrage comparatif du virus est réalisé sur les cellules traitées ou non par le désinfectant afin de tester la réduction de sensibilité des cellules au virus en présence du produit. 5 ml de la plus basse dilution en milieu de culture apparemment non cytotoxique du désinfectant ou de PBS dilué en milieu de culture sont mélangés avec 5 ml de cellules MT4. Après 1 h à 37°C en présence de 5% de CO₂, les cellules sont centrifugées, reprises dans du milieu de culture, et distribuées en plaque 24 puits pour culture cellulaire. Puis 0,1 ml de virus dilués de 10⁻² à 10⁻⁸ dans du milieu de culture, est distribué en triplicat en parallèle sur les cellules traitées ou non traitées. La culture est maintenue à 37°C en présence de 5% de CO₂ par passage pendant environ 2 semaines. L'apparition d'un effet cytopathogène (ECP) caractéristique est évaluée régulièrement par lecture au microscope. En fin de culture, un lysat cellulaire est effectué par addition de tampon Tris-EDTA contenant 0,1% de Triton X100 et la présence de la protéine P24 spécifique du virus VIH1 dans les cellules est mise en évidence à l'aide d'un test immunoenzymatique (trousse INNOTEST HIV Antigen mAb, INNOGENETICS).

A comparative virus titration is performed on cells that have or have not been treated with the disinfectant to check the reduction of the cells sensitivity to the virus. 5 ml of the lowest apparently non-cytotoxic dilution of the disinfectant in culture medium or of PBS diluted in culture medium are diluted with 5 ml of MT4 cells. After 1 h at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere, the cells are centrifuged, resuspended in culture medium and distributed in 24 wells plates for cellular culture. Then 0.1 ml of virus diluted from 10⁻² to 10⁻² with culture medium was added in triplicate on treated or untreated cells in parallel. The culture is maintained at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere by passage during approximately 2 weeks. The appearance of a characteristic cytopathogenic effect (ECP) is evaluated regularly by reading the plates under the microscope. At the end of the culture, a cellular lysate is carried out by addition of Tris-EDTA buffer containing 0,1% of Triton X100 and the presence of intracellular HIV1 P24 protein is highlighted thanks to an immunoassay (kit INNOTEST HIV Antigen mAb, INNOGENETICS).

d) Mesure de l'activité virucide du produit / *Determination of virucidal activity*

Les essais de virucidie du produit consistent à mettre en contact 1 volume de suspension de virus avec 1 volume de substance interférente et 8 volumes de la solution d'essai. Après différents temps de contact à une température de 20°C +/- 1°C, un aliquot de mélange est prélevé et filtré sur colonne Microspin S-400 HR. La présence de virus résiduel dans le filtrat est évaluée en déposant 0,1ml de solution en triplicat sur des cellules MT4 distribuées en plaque 24 puits pour culture cellulaire. Les cellules sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂ pendant environ 2 semaines. L'apparition d'un effet cytopathogène (ECP) caractéristique est évaluée régulièrement par lecture au microscope. En fin de culture, un lysat cellulaire est effectué par addition de tampon Tris-EDTA contenant 0,1% de Triton X100 et la présence de la protéine P24 spécifique du

virus VIH1 dans les cellules est mise en évidence à l'aide d'un test immunoenzymatique (trousse INNOTEST HIV Antigen mAb, INNOGENETICS).

To test the virucidal activity of the product 1 part by volume of virus was incubated at 20°C +/- 1°C with 1 part by volume of interfering substances and 8 parts by volume of the solution of disinfectant. After different times of contact, an aliquot of mixture was taken and filtered on Microspin S-400 HR column. The presence of residual virus in the filtrate is evaluated by depositing 0,1ml of solution in triplicat on MT4 cells distributed in 24 wells plate for cellular culture. The culture is maintained at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere by passage during approximately 2 weeks. The appearance of a characteristic cytopathogenic effect (ECP) is evaluated regularly by reading the plates under the microscope. At the end of the culture, a cellular lysate is carried out by addition of Tris-EDTA buffer containing 0,1% of Triton X100 and the presence of intracellular HIV1 P24 protein is highlighted thanks to an immunoassay (kit INNOTEST HIV Antigen mAb, INNOGENETICS).

e) *Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / Control of efficiency for suppression of disinfectant activity*

Huit Volumes des solutions d'essai du produit sont additionnés à 1 volume de milieu de culture et 1 volume de substance interférente. Immédiatement après la préparation du mélange, au temps 0, 0,1ml du mélange sont filtrées sur colonne Microspin S-400 HR. Les filtrats additionnés de 1/10^{ème} de virus sont ensuite incubés pendant 30 min dans un bain de glace fondante. Puis 0,1 ml de virus dilués de 10⁻² à 10⁻⁸ dans du milieu de culture, est distribué en triplicat en parallèle sur les cellules traitées ou non traitées. La culture est maintenue à 37°C en présence de 5% de CO₂ par passage pendant environ 2 semaines. L'apparition d'un effet cytopathogène (ECP) caractéristique est évaluée régulièrement par lecture au microscope. En fin de culture, un lysat cellulaire est effectué par addition de tampon Tris-EDTA contenant 0,1% de Triton X100 et la présence de la protéine P24 spécifique du virus VIH1 dans les cellules est mise en évidence à l'aide d'un test immunoenzymatique (trousse INNOTEST HIV Antigen mAb, INNOGENETICS).

Eight parts by volume of solutions of disinfectant are mixed with 1 part by volume of interfering substances and 1 part by volume of culture medium. Immediately after preparation of the mixture, at time 0, 0.1ml of the mixtures are filtered on Microspin S-400 HR column. Then nine parts by volume of the filtrates are mixed with one part by volume of virus and the mixtures are leaved in an ice bath for 30 min. Then 0.1 ml of virus diluted from 10⁻² to 10⁻² with culture medium was added in triplicate on treated or untreated cells in parallel. The culture is maintained at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere by passage during approximately 2 weeks. The appearance of a characteristic cytopathogenic effect (ECP) is evaluated regularly by reading the plates under the microscope. At the end of the culture, a cellular lysate is carried out by addition of Tris-EDTA buffer containing 0,1% of Triton X100 and the presence of intracellular HIV1 P24 protein is highlighted thanks to an immunoassay (kit INNOTEST HIV Antigen mAb, INNOGENETICS).

V- Résultats / Results

1) Détermination de la dilution subcytotoxique du produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** et du filtrat sur colonne Microspin / *Determination of subcytotoxic dilution of product **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** and filtrate on Microspin column :*

| Méthode / Method | Dilution subcytotoxique / subcytotoxic dilution | | | |
|---|---|--|---|---|
| | Dermanios Scrub Chlorexhidine 4% (80%) | Dermanios Scrub Chlorexhidine 4% (50%) | Dermanios Scrub Chlorexhidine 4% (5%) | Dermanios Scrub Chlorexhidine 4% (0.1%) |
| Technique par dilution / <i>Dilution method</i> | 1/10 000 | 1/5 000 | 1/1 000 | 1/100 |
| Filtration sur Microspin / <i>Microspin filtration</i> | 1/100 | 1/10 | 1/10 | 1/10 |

2) Evaluation de la sensibilité des cellules au produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% / Evaluation of cell sensitivity to **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%****

Tableau des résultats de sensibilité des cellules MT4 au produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** (80%) lors de l'infection par le virus VIH1

Table on evaluation of cell sensitivity of MT4 cells to **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** (80%) when infected by HIV1

| | Evaluation de l'effet cytopathogène viral (microscopie) / Evaluation of viral cytopathogene effect (microscopy) | | | | | | P24 Lyse terminale / Terminal lysis (DO _{450nm} / OD _{450nm}) |
|---|--|-----|-----|-------|---------------|------|---|
| | Dilution du surnageant viral / Dilution of viral supernatant | J+1 | J+4 | J+8 | J+11 | J+14 | |
| Cellules non traitées / Non treated cells | 10 ⁻³ | 0 | ++ | ++++ | ++++ | ++++ | n.t. |
| | 10 ⁻⁴ | 0 | + | +++ | ++++ | ++++ | 3.427 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 | 0 | ++ | ++++ | ++++ | 3.191 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 | 0 | +/0/0 | +++ / ++ / ++ | ++++ | 3.297 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.075 |
| | 10 ⁻⁸ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.068 |
| | 10 ⁻⁹ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | n.t. |
| Cellules traitées / Treated cells | 10 ⁻³ | 0 | ++ | ++++ | ++++ | ++++ | n.t. |
| | 10 ⁻⁴ | 0 | + | +++ | ++++ | ++++ | 3.408 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 | 0 | ++ | ++++ | ++++ | 3.234 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 | 0 | +/0/+ | ++ / + / +++ | ++++ | 3.405 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.065 |
| | 10 ⁻⁸ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.063 |
| | 10 ⁻⁹ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | n.t. |
| Cellule MT4 / MT4 cell | n.a. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.066 |

Légende / legend :

0 : ECP non détecté / CPE not detected

+

++ : ECP < 50% / CPE < 50%

+++ : ECP < 75% / CPE < 75%

++++ : ECP maximum (100%) / CPE maximum (100%)

n.t. : non soumis à l'essai / not tested

n.a. : non applicable / not applicable

Conclusion / Conclusion

Le titre infectieux des surnageants viraux obtenus sur cellules MT4 traitées ou non traitées par le produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** sont de 10^{6,50} DICT₅₀/0,1ml après 2 semaines de culture.

The infectious titer of the viral supernatants obtained on MT4 cells treated or non-treated with the product **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** are 10^{6,50} TCID₅₀/0.1ml after 2 weeks of culture.

3) Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / Control of efficiency for suppression of disinfectant activity

Tableau des résultats de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit DERMANIOS SCRUB
CHLORHEXIDINE 4%

Table on efficiency for suppression of DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%'s activity

| Evaluation de l'effet cytopathogène viral (microscopie) / Evaluation of viral cytopathogene effect (microscopy) | | | | | | | P24 Lyse terminale / Terminal lysis (DO _{450nm} / OD _{450nm}) |
|--|---|-----|-----|--------|--------------|-----------------|---|
| Produit / Product | Dilution du surnageant viral / Dilution of viral supernatant | J+1 | J+4 | J+8 | J+11 | J+14 | |
| Témoin / Control | 10 ⁻² | 0 | ++ | ++++ | ++++ | ++++ | n.t. |
| | 10 ⁻³ | 0 | + | +++ | ++++ | ++++ | 3.209 |
| | 10 ⁻⁴ | 0 | 0 | +/+ | +++ | ++++ | 3.341 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 | 0 | 0 | +/>++ /++ | ++++ | 3.174 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.076 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.091 |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (80%) | 10 ⁻² | 0 | ++ | ++++ | ++++ | ++++ | n.t. |
| | 10 ⁻³ | 0 | + | +++ | ++++ | ++++ | 3.422 |
| | 10 ⁻⁴ | 0 | 0 | +/>+ | +++ | ++++ | 3.339 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 | 0 | 0 | +/>++ /0 | +/>++ ++++/0 | 0.085/3.408 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.073 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.079 |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (50%) | 10 ⁻² | 0 | ++ | ++++ | ++++ | ++++ | n.t. |
| | 10 ⁻³ | 0 | + | +++ | ++++ | ++++ | 3.308 |
| | 10 ⁻⁴ | 0 | 0 | ++ | +++ | ++++ | 3.442 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 | 0 | 0 | +/>+ /++ | ++++ | 3.327 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.069 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.084 |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (5%) | 10 ⁻² | 0 | ++ | ++++ | ++++ | ++++ | n.t. |
| | 10 ⁻³ | 0 | + | +++ | ++++ | ++++ | 3.349 |
| | 10 ⁻⁴ | 0 | 0 | ++ | +++ | ++++ | 3.196 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 | 0 | +/>0/0 | ++ | ++++ | 3.201 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.080 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.066 |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (0.1%) | 10 ⁻² | 0 | ++ | ++++ | ++++ | ++++ | n.t. |
| | 10 ⁻³ | 0 | + | +++ | ++++ | ++++ | 3.147 |
| | 10 ⁻⁴ | 0 | 0 | + | ++++ | ++++ | 3.584 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 | 0 | 0 | +/>++ /++ | ++++ | 3.638 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.070 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.066 |
| Cellule MT4 / MT4 cells | n.a. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.072 |

Légende / legend :

0 : ECP non détecté / *CPE not detected*

+ : ECP < 25% / *CPE < 25%*

++ : ECP < 50% / *CPE < 50%*

+++ : ECP < 75% / *CPE < 75%*

++++ : ECP maximum (100%) / *CPE maximum (100%)*

n.t. : non soumis à l'essai / *not tested*

n.a. : non applicable / *not applicable*

4) Evaluation de l'effet virucide du produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE**

4% / Evaluation of virucidal activity of **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% :**

Tableau des résultats de virucidie du produit DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% en conditions de saleté sur le virus VIH1

Table on virucidal activity of DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% in dirty conditions on HIV1

| Evaluation de l'effet cytopathogène viral (microscopie) / Evaluation of viral cytopathogene effect (microscopy) | | | | | | | | P24 Lyse terminale / Terminal lysis (DO _{450nm} / OD _{450nm}) |
|--|------------------|---|------|------|------|------|------|---|
| Produit / Product | Temps / times | Substance interférente / Interfering solution | J+1 | J+4 | J+8 | J+11 | J+14 | |
| Témoin virus / Virus control | 0 min. | 3 g/l SAB et 3 ml/l hématies de mouton / 3 g/l BSA and 3 ml/l sheep erythrocyte | 0 | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | 3.377 |
| | 3 min. | | 0 | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | 3.209 |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (80%) | 0 min. | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.050 |
| | 0.5 min. | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.055 |
| | 1.5 min | | Tox. | Tox. | Tox. | Tox. | Tox. | n.a. |
| | 3 min. | | Tox. | Tox. | Tox. | Tox. | Tox. | n.a. |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (50%) | 0 min. | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.050 |
| | 0.5 min. | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.054 |
| | 1.5 min | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.053 |
| | 3 min. | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.050 |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (5%) | 0 min. | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.058 |
| | 0.5 min. | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.056 |
| | 1.5 min | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.054 |
| | 3 min. | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.058 |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (0.1%) | 0 min. | | 0 | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | 3.328 |
| | 3 min. | | 0 | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | 3.396 |
| Cellule MT4 / MT4 cells | n.a. | n.a. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.055 |

Légende / legend :

0 : ECP non détecté / CPE not detected

+: ECP < 25% / CPE < 25%

++ : ECP < 50% / CPE < 50%

+++ : ECP < 75% / CPE < 75%

++++ : ECP maximum (100%) / CPE maximum (100%)

Tox. : toxique / toxic

n.t. : non soumis à l'essai / not tested

n.a. : non applicable / not applicable

Conclusion / Conclusion

L'absence de détection d'ECP dans la lignée cellulaire MT4 et de protéine P24 dans le surnageant signifie que le titre infectieux du surnageant viral est inférieur à 10^{0,5} DICT₅₀/0,1ml après 2 semaines de culture.

The lack of detection of CPE in the MT4 cell line and P24 protein in the supernatant indicates that the infectious titer of viral supernatant is less than 10^{0.5} TCID₅₀/0.1ml after 2 weeks of culture.

VI- Conclusion / Conclusion

Le produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** est actif (réduction ≥ 4 log du titre viral) à la concentration de 80%, 50% et 5% après un temps de contact de 30 secondes, selon la norme NF EN 14476, dans des conditions de saleté vis-à-vis du Virus de l'Immunodéficience Humaine de type1 (VIH1).

*Product **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** is active (reduction ≥ 4 log of the viral titer) at the concentration of 80%, 50% and 5% after 30 seconds of exposure time, according to the standard NF EN 14476, in dirty conditions against the Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV1).*

Lille, le 10 juin 2014

Responsable technique

Dr. P. E. LOBERT



Chef de Service

Pr. D. HOBER



Annexe 1 / Annex 1 :

Titre infectieux du surnageant viral expérimental

Infectious level of the experimental viral supernatant

| Evaluation de l'effet cytopathogène viral (microscopie) / <i>Evaluation of viral cytopathogene effect (microscopy)</i> | | | | | | P24 Lyse terminale / <i>Terminal lysis</i> (DO _{450nm} / OD _{450nm}) |
|--|-----|-----|------|------|------|--|
| Dilution du surnageant viral / <i>Dilution of viral supernatant</i> | J+1 | J+4 | J+8 | J+11 | J+14 | |
| 10 ⁻³ | 0 | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | n.t. |
| 10 ⁻⁴ | 0 | ++ | ++++ | ++++ | ++++ | 3.186 |
| 10 ⁻⁵ | 0 | + | +++ | ++++ | ++++ | 3.301 |
| 10 ⁻⁶ | 0 | 0 | + | +++ | ++++ | 3.426 |
| 10 ⁻⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.051 |
| 10 ⁻⁸ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.049 |
| 10 ⁻⁹ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | n.t. |
| Cellule MT4 / <i>MT4 cell</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.055 |

Légende / legend :

0 : ECP non détecté / *CPE not detected*

+: ECP < 25% / *CPE < 25%*

++ : ECP < 50% / *CPE < 50%*

+++ : ECP < 75% / *CPE < 75%*

++++ : ECP maximum (100%) / *CPE maximum (100%)*

n.t. : non soumis à l'essai / *not tested*

Conclusion / Conclusion

Le titre infectieux du surnageant viral expérimental évalué par mesure de l'infectivité pour la lignée continue MT4 est de 10^{6,50} DICT₅₀/0,1ml après 2 semaines de culture.

The infectious titer of the experimental viral supernatant evaluated by measuring the infectivity to the MT4 cell line is 10^{6.50} TCID₅₀/0.1ml after 2 weeks of culture.

Annexe 2 / Annex 2 :

Titre infectieux des témoins virus du test de virucidie

Infectious level of control virus in the virucidal test

| | Evaluation de l'effet cytopathogène viral (microscopie) / <i>Evaluation of viral cytopathogene effect (microscopy)</i> | | | | | | P24 Lyse terminale / <i>Terminal lysis</i> (DO _{450nm} / OD _{450nm}) |
|--|--|-----|-----|-------|--------------|-----------------|--|
| | Dilution du filtrat / <i>Dilution of filtrate</i> | J+1 | J+4 | J+8 | J+11 | J+14 | |
| Témoin virus 0 min. / <i>Virus control</i> 0 min. | 10 ⁻² | 0 | ++ | ++++ | ++++ | ++++ | n.t. |
| | 10 ⁻³ | 0 | + | +++ | ++++ | ++++ | 3.528 |
| | 10 ⁻⁴ | 0 | 0 | ++ | ++++ | ++++ | 3.504 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 | 0 | +/0/+ | +++/0 +++ | ++++/0 /++++ | 0.059/3.366 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.049 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.051 |
| Témoin virus 3 min. / <i>Virus control</i> 3 min. | 10 ⁻² | 0 | ++ | ++++ | ++++ | ++++ | n.t. |
| | 10 ⁻³ | 0 | + | +++ | ++++ | ++++ | 3.545 |
| | 10 ⁻⁴ | 0 | 0 | ++ | ++++ | ++++ | 3.281 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 | 0 | +/+0 | +++/ +++0 | ++++/ ++++0 | 0.056/3.054 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.056 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.055 |
| Cellule MT4 / <i>MT4 cell</i> | n.a. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.055 |

Légende / legend :

0 : ECP non détecté / *CPE not detected*

+: ECP < 25% / *CPE < 25%*

++ : ECP < 50% / *CPE < 50%*

+++ : ECP < 75% / *CPE < 75%*

++++ : ECP maximum (100%) / *CPE maximum (100%)*

n.t. : non soumis à l'essai / *not tested*

n.a. : non applicable / *not applicable*

Conclusion / Conclusion

Le titre infectieux des témoins virus du test de virucidie à 0 et 15 minutes d'incubation, évalués par mesure de l'infectivité pour la lignée continue MT4, sont de 10^{5,16} DICT₅₀/0,1ml après 2 semaines de culture.

The infectious titer of control virus in the virucidal test after 0 and 15 minutes of incubation, evaluated by measuring the infectivity to the MT4 cell line, are respectively 10^{5.16} TCID₅₀/0.1ml after 2 weeks of culture.

Annexe 3 / Annex 3 :

Données brutes relatives aux tests réalisés

Raw data about the assays

- Détermination de la dilution subcytotoxique du produit DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% et du filtrat sur colonne Microspin / *Determination of subcytotoxic dilution of product DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% and filtrate on Microspin column :*

| Produit | Méthode / Method | Dilution (log) | | | | | | | |
|---|--|----------------|------|------|-------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Dermanios Scrub Chlorexhidine 4% (80%) | Technique par dilution / <i>Dilution method</i> | Tox. | Tox. | Tox. | Tox. | 0 | n.t. | n.t. | n.t. |
| | Filtration sur Microspin / <i>Microspin filtration</i> | Tox. | 0 | 0 | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. |
| Dermanios Scrub Chlorexhidine 4% (50%) | Technique par dilution / <i>Dilution method</i> | Tox. | Tox. | Tox. | Tox.* | 0 | n.t. | n.t. | n.t. |
| | Filtration sur Microspin / <i>Microspin filtration</i> | 0 | 0 | 0 | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. |
| Dermanios Scrub Chlorexhidine 4% (5%) | Technique par dilution / <i>Dilution method</i> | Tox. | Tox. | 0 | 0 | 0 | n.t. | n.t. | n.t. |
| | Filtration sur Microspin / <i>Microspin filtration</i> | 0 | 0 | 0 | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. |
| Dermanios Scrub Chlorexhidine 4% (0.1%) | Technique par dilution / <i>Dilution method</i> | Tox. | 0 | 0 | 0 | 0 | n.t. | n.t. | n.t. |
| | Filtration sur Microspin / <i>Microspin filtration</i> | 0 | 0 | 0 | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. |

Légende / legend :

Tox. : Toxique / Toxic

Tox.* : Toxicité partielle / Partial toxicity

n.t. : non soumis à l'essai / non tested

- Evaluation de la sensibilité des cellules au produit DERMANIOS SCRUB
 CHLORHEXIDINE 4% / Evaluation of cell sensitivity to DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%

| | | Evaluation de l'effet cytopathogène viral (microscopie) / Evaluation of viral cytopathogene effect (microscopy) | | | | | P24 Lyse terminale / Terminal lysis (DO _{450nm} / OD _{450nm}) | |
|---|--|---|-------|-------|-------|-------|---|-------------------|
| | | Dilution du surnageant viral / Dilution of viral supernatant | J+1 | J+4 | J+8 | J+11 | | J+14 |
| Dermanios Scrub Chlorexhidine 4% (80%) | Cellules non traitées / Non treated cells | 10 ⁻³ | 0 0 0 | 2 2 2 | 4 4 4 | 4 4 4 | 4 4 4 | n.t. |
| | | 10 ⁻⁴ | 0 0 0 | 1 1 1 | 3 3 3 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.445/3.409 |
| | | 10 ⁻⁵ | 0 0 0 | 0 0 0 | 2 2 2 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.352/3.029 |
| | | 10 ⁻⁶ | 0 0 0 | 0 0 0 | 1 0 0 | 3 2 2 | 4 4 4 | 3.269/3.274/3.349 |
| | | 10 ⁻⁷ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.064/0.079/0.081 |
| | | 10 ⁻⁸ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.071/0.065 |
| | | 10 ⁻⁹ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | n.t. |
| | Cellules traitées / Treated cells | 10 ⁻³ | 0 0 0 | 2 2 2 | 4 4 4 | 4 4 4 | 4 4 4 | n.t. |
| | | 10 ⁻⁴ | 0 0 0 | 1 1 1 | 3 3 3 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.586/3.230 |
| | | 10 ⁻⁵ | 0 0 0 | 0 0 0 | 2 2 2 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.272/3.195 |
| | | 10 ⁻⁶ | 0 0 0 | 0 0 0 | 1 0 1 | 2 1 3 | 4 4 4 | 3.373/3.409/3.432 |
| | | 10 ⁻⁷ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.068/0.067/0.060 |
| | | 10 ⁻⁸ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.063/0.063 |
| | 10 ⁻⁹ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | n.t. | |
| | Cellule MT4 / MT4 cell | n.a. | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.069/0.068/0.062 | |

Légende / legend :

1 à 4 : virus présents, degré de l'ECP dans 3 puits de plaques 24 puits

0 : aucun virus présent

n.t. : non soumis à l'essai / not tested

n.a. : non applicable / not applicable

- Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / Control of efficiency for suppression of disinfectant activity

| Evaluation de l'effet cytopathogène viral (microscopie) / Evaluation of viral cytopathogene effect (microscopy) | | | | | | | P24 Lyse terminale / Terminal lysis (DO _{450nm} / OD _{450nm}) |
|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| Produit / Product | Dilution du surnageant viral / Dilution of viral supernatant | J+1 | J+4 | J+8 | J+11 | J+14 | |
| Témoin / Control | 10 ⁻² | 0 0 0 | 2 2 2 | 4 4 4 | 4 4 4 | 4 4 4 | n.t. |
| | 10 ⁻³ | 0 0 0 | 1 1 1 | 3 3 3 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.201/3.218 |
| | 10 ⁻⁴ | 0 0 0 | 0 0 0 | 1 1 2 | 3 3 3 | 4 4 4 | 3.332/3.349 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 1 2 2 | 4 4 4 | 3.230/3.140/3.151 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.076/0.079/0.073 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.090/0.092 |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (80%) | 10 ⁻² | 0 0 0 | 2 2 2 | 4 4 4 | 4 4 4 | 4 4 4 | n.t. |
| | 10 ⁻³ | 0 0 0 | 1 1 1 | 3 3 3 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.302/3.541 |
| | 10 ⁻⁴ | 0 0 0 | 0 0 0 | 1 1 2 | 3 3 3 | 4 4 4 | 3.231/3.447 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 2 2 0 | 4 4 0 | 3.399/3.416/0.085 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.071/0.083/0.064 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.060/0.097 |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (50%) | 10 ⁻² | 0 0 0 | 2 2 2 | 4 4 4 | 4 4 4 | 4 4 4 | n.t. |
| | 10 ⁻³ | 0 0 0 | 1 1 1 | 3 3 3 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.340/3.585 |
| | 10 ⁻⁴ | 0 0 0 | 0 0 0 | 2 2 2 | 3 3 3 | 4 4 4 | 3.653/3.230 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 2 1 2 | 4 4 4 | 3.643/3.201/3.138 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.075/0.068/0.063 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.078/0.089 |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (5%) | 10 ⁻² | 0 0 0 | 2 2 2 | 4 4 4 | 4 4 4 | 4 4 4 | n.t. |
| | 10 ⁻³ | 0 0 0 | 1 1 1 | 3 3 3 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.318/3.381 |
| | 10 ⁻⁴ | 0 0 0 | 0 0 0 | 2 2 2 | 3 3 3 | 4 4 4 | 3.298/3.093 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 0 0 | 0 0 0 | 1 0 0 | 2 2 2 | 4 4 4 | 3.180/3.173/3.248 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.076/0.076/0.087 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.061/0.071 |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (0.1%) | 10 ⁻² | 0 0 0 | 2 2 2 | 4 4 4 | 4 4 4 | 4 4 4 | n.t. |
| | 10 ⁻³ | 0 0 0 | 1 1 1 | 3 3 3 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.201/3.093 |
| | 10 ⁻⁴ | 0 0 0 | 0 0 0 | 2 2 2 | 3 3 3 | 4 4 4 | 3.575/3.592 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 1 2 2 | 4 4 4 | 3.416/3.708/3.789 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.074/0.065/0.071 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.064/0.067 |
| Cellule MT4 / MT4 cells | n.a. | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.068/0.079/0.071 |

Légende / legend :

1 à 4 : virus présents, degré de l'ECP dans 3 puits de plaques 24 puits

0 : aucun virus présent

n.t. : non soumis à l'essai / non tested

n.a. : non applicable / *not applicable*

- Evaluation de l'effet virucide du produit DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% /
 Evaluation of virucidal activity of DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%

| Evaluation de l'effet cytopathogène viral (microscopie) / Evaluation of viral cytopathogene effect (microscopy) | | | | | | | | P24 Lyse terminale / Terminal lysis (DO _{450nm} / OD _{450nm}) |
|--|------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------------------|---|
| Produit / Product | Temps / times | Substance interférente / Interfering solution | J+1 | J+4 | J+8 | J+11 | J+14 | |
| Témoin virus / Virus control | 0 min. | 3 g/l SAB et 3 ml/l hématies de mouton / 3 g/l BSA and 3 ml/l sheep erythrocyte | 0 0 0 | 3 3 3 | 4 4 4 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.402/3.228/3.501 |
| | 3 min. | | 0 0 0 | 3 3 3 | 4 4 4 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.198/3.272/3.158 |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (80%) | 0 min. | | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.044/0.048/0.058 |
| | 0.5 min. | | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.056/0.053/0.056 |
| | 1.5 min. | | Tox. | Tox. | Tox. | Tox. | Tox. | n.a. |
| | 3 min. | | Tox. | Tox. | Tox. | Tox. | Tox. | n.a. |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (50%) | 0 min. | | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.048/0.049/0.052 |
| | 0.5 min. | | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.050/0.059/0.053 |
| | 1.5 min. | | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.055/0.055/0.048 |
| | 3 min. | | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.053/0.050/0.046 |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (5%) | 0 min. | | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.061/0.055/0.058 |
| | 0.5 min. | | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.058/0.053/0.057 |
| | 1.5 min. | | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.048/0.052/0.062 |
| | 3 min. | | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.058/0.054/0.061 |
| Dermanios Scrub Chlorexidine 4% (0.1%) | 0 min. | 0 0 0 | 3 3 3 | 4 4 4 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.501/3.295/3.188 | |
| | 3 min. | 0 0 0 | 3 3 3 | 4 4 4 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.184/3.548/3.457 | |
| Cellule MT4 / MT4 cells | n.a. | n.a. | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.051/0.057/0.052 /0.059 |

Légende / legend :

1 à 4 : virus présents, degré de l'ECP dans 3 puits de plaques 24 puits

0 : aucun virus présent

Tox. : Toxique / Toxic

n.a. : non applicable / not applicable

- Titre infectieux du surnageant viral expérimental / *Infectious level of the experimental viral supernatant*

| Evaluation de l'effet cytopathogène viral (microscopie) / <i>Evaluation of viral cytopathogene effect (microscopy)</i> | | | | | | P24 Lyse terminale / <i>Terminal lysis</i> (DO _{450nm} / OD _{450nm}) |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| Dilution du surnageant viral / <i>Dilution of viral supernatant</i> | J+1 | J+4 | J+8 | J+11 | J+14 | |
| 10 ⁻³ | 0 0 0 | 3 3 3 | 4 4 4 | 4 4 4 | 4 4 4 | n.t. |
| 10 ⁻⁴ | 0 0 0 | 2 2 2 | 4 4 4 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.214/3.158 |
| 10 ⁻⁵ | 0 0 0 | 1 1 1 | 3 3 3 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.189/3.412 |
| 10 ⁻⁶ | 0 0 0 | 0 0 0 | 2 1 1 | 3 3 3 | 4 4 4 | 3.274/3.439/3.566 |
| 10 ⁻⁷ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.050/0.055/0.049 |
| 10 ⁻⁸ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.048/0.050 |
| 10 ⁻⁹ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | n.t. |
| Cellule MT4 / <i>MT4 cell</i> | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.051/0.057/0.052/ 0.059 |

Légende / legend :

1 à 4 : virus présents, degré de l'ECP dans 3 puits de plaques 24 puits

0 : aucun virus présent

n.t. : non soumis à l'essai / non tested

- Titre infectieux des témoins virus du test de virucidie / *Infectious level of control virus in the virucidal test*

| | Evaluation de l'effet cytopathogène viral (microscopie) / <i>Evaluation of viral cytopathogene effect (microscopy)</i> | | | | | | P24 Lyse terminale / <i>Terminal lysis</i> (DO _{450nm} / OD _{450nm}) |
|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | Dilution du filtrat / <i>Dilution of filtrate</i> | J+1 | J+4 | J+8 | J+11 | J+14 | |
| Témoin virus 0 min. / <i>Virus control</i> 0 min. | 10 ⁻² | 0 0 0 | 2 2 2 | 4 4 4 | 4 4 4 | 4 4 4 | n.t. |
| | 10 ⁻³ | 0 0 0 | 1 1 1 | 3 3 3 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.548/3.508 |
| | 10 ⁻⁴ | 0 0 0 | 0 0 0 | 3 2 2 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.557/3.450 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 0 0 | 0 0 0 | 1 0 1 | 3 0 3 | 4 0 4 | 3.288/0.059/3.443 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.050/0.049/0.048 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.054/0.048 |
| Témoin virus 3 min. / <i>Virus control</i> 3 min. | 10 ⁻² | 0 0 0 | 2 2 2 | 4 4 4 | 4 4 4 | 4 4 4 | n.t. |
| | 10 ⁻³ | 0 0 0 | 1 1 1 | 3 3 3 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.288/3.802 |
| | 10 ⁻⁴ | 0 0 0 | 0 0 0 | 2 2 2 | 4 4 4 | 4 4 4 | 3.443/3.119 |
| | 10 ⁻⁵ | 0 0 0 | 0 0 0 | 1 1 0 | 3 3 0 | 4 4 0 | 3.032/3.076/0.056 |
| | 10 ⁻⁶ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.058/0.056/0.055 |
| | 10 ⁻⁷ | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.059/0.050 |
| Cellule MT4 / <i>MT4 cell</i> | n.a. | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0.051/0.057/0.052/ 0.059 |

Légende / legend :

1 à 4 : virus présents, degré de l'ECP dans 3 puits de plaques 24 puits

0 : aucun virus présent

n.t. : non soumis à l'essai / *not tested*

n.a. : non applicable / *not applicable*

Laboratoire de Virologie – UPRES EA3610
CHRU de Lille – Université de Lille 2
Institut Hippocrate, Parc Eurasanté
152 rue du Dr Yersin
59120 Loos lez Lille
France
Tel : (33) 03.20.44.66.88/48.93/69.30
Fax : (33) 03.20.44.48.95
Email : didier.hober@chru-lille.fr

N° de rapport : 2011/27424
Date d'édition : 12/08/2011

**RAPPORT D'ESSAI
DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE
DU PRODUIT DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%**

**Selon la Norme NF EN 14476+A1 (Janvier 2007)
Vis à vis du Virus de la Pseudorabie porcine (PRV)
(Substitut du Virus de l'Hépatite B)**

*EVALUATION OF THE
VIRUCIDAL EFFECT OF
DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%*

*Test method according to the standard NF EN 14476+A1 (January 2007)
Against Pseudorabies Virus (PRV)
(Surrogate of Hepatitis B Virus)*

Rapport pour / Report submitted to:

**LABORATOIRES ANIOS
Pavé du moulin
59260 Lille Hellemmes
France**

Ce rapport d'essai ne concerne que le produit (cité ci-après) soumis à l'essai.
This trial report concerns only the product (quoted this later) subjected on approval

Ce document comporte 11 pages numérotées et 1 annexe
This report is made of 11 numbered pages and 1 annex

La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous la forme de fac-simile photographique
intégral

The reproduction of this trial report is authorized only under the shape of complete photographic reproduction

I- Introduction / Introduction

A la demande de la société ANIOS, le désinfectant **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** a été évalué pour ses propriétés inactivatrices contre la souche NIA-3 du Virus de la Pseudorabie Porcine (PRV) comme virus modèle du Virus de l'Hépatite B (VHB). L'essai a été effectué selon la norme NF EN 14476+A1 : Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai virucide quantitatif de suspension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine – Janvier 2007.

*As requested by the ANIOS Society, the **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** disinfectant was evaluated for its virucidal inactivating properties against Pseudorabies Virus (PRV) strain NIA-3 as a model virus to Hepatitis B Virus (HBV). The testing was carried out in accordance with the standard of NF EN 14476+A1: Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine – January 2007.*

II- Identification du produit / Identification of sample

- Nom du produit / *Name of the product* : Dermanios Scrub Chlorhexidine 4%
- Fabricant / *Manufacturer* : Laboratoires ANIOS
- N° de lot – N° de formule / *Lot N° - Formula N°* : JO344 10 05
- Date de réception / *Date of receipt* : 15/06/11
- Application / *Use* : Lavage hygiénique et désinfection chirurgicale des mains / *Hygienic hands washing and surgical hands disinfection*
- Aspect du produit / *Appearance of product* : Liquide limpide et rose / *Clear and pink liquid*
- pH du produit / *pH Value* : Non Dilué (20°C) pH=5,40 / *Undiluted (20°C) pH=5.40*
- Conditions de stockage / *Conditions of storage* : Température ambiante, à l'abri de la lumière / *Room temperature in the dark*

III- Conditions expérimentales / Experimental conditions

- Période d'essai / *Period of analysis* : du 15/06/11 au 06/07/11 / *Through 15/06/11 to 06/07/11*
- Température d'essai / *Test temperature* : 20°C +/- 1°C
- Concentrations en produit testées / *Concentration of test product* : 80%, 50%, 5% et / *and 0.1%*
- Temps de contact / *Contact times* : 30 secondes / *seconds, 1.5 et / and 3 minutes*
- Diluant du produit / *Diluent of product* : Eau pour préparation injectable / *Water for injection*
- Substances interférentes / *Interfering substances* : Solution tamponnée au phosphate (PBS) / *Phosphate buffer saline (PBS)*
- Méthode pour stopper l'activité du produit / *Procedure to inactivate the product* : Gel filtration

IV- Matériel et Méthodes / Material and methods

1- Matériel / Material

a) Virus / Virus

La souche NIA-3 de la Pseudorabies Porcine (PRV), a été fournie par le Dr. Daniel DORY de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA, Ploufragan, France).

The Pseudorabies Virus (PRV) strain NIA-3 was obtained from Dr Daniel DORY, French Agency for Food Safety (AFSSA, Ploufragan, France).

b) Lignée cellulaire / Cell line

La lignée cellulaire Vero (ATCC CCL-81) utilisée pour cultiver le virus de la Pseudorabies Porcine (PRV) provient de l'European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France).

The Vero cell line (ATCC CCL-81) used with the Pseudorabies Virus (PRV) was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France).

2- Méthodes d'essai / Methods

a) Titrage viral / Determination of infectivity

Les suspensions virales traitées ou non traitées par le produit à tester sont diluées en série de 10^{-1} à 10^{-8} , dans du Milieu Eagle MEM modifié Dulbecco (DMEM, Invitrogen, France) avec 2% de sérum de veau foetal (SVF, Invitrogen, France) glacé. 0,1 ml de chaque dilution est ensuite transféré dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établi de cellules Vero, en commençant par la dilution la plus élevée. Après une heure d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est additionné à chaque puits. La lecture de l'effet cytopathogène (ECP) se fait au microscope inversé après 5 et 7 jours d'incubation. Le calcul du titre de l'infectivité virale (\log_{10} DICT₅₀/ml) est déterminé par la méthode Spearman-Kärber.

The viral suspensions treated or non-treated with the product were diluted from 10^1 to 10^8 in ice-cold Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, France) containing 2% fetal calf serum (FCS, Invitrogen, France). 0.1 ml of each dilution was transferred, beginning with the highest dilution, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established Vero monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytopathic effect (CPE) was read by using an inverted microscope after 5 and 7 days in a 5% CO₂-atmosphere. Calculation of estimated virus concentration (\log_{10} TCID₅₀/ml) was carried out by the Spearman-Kärber method.

b) Détermination de la concentration subcytotoxique du produit / *Determination of cytotoxicity of the product*

Les solutions d'essai du produit additionnées de 1/5^{ème} d'eau pour préparation injectable sont diluées de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu DMEM 2% SVF glacé. 0,1 ml de chaque dilution est distribué dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établi de cellules Vero. Après une incubation d'une heure à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est ajouté aux puits. L'effet subcytotoxique est apprécié après une incubation de 5 et 7 jours en présence de 5% de CO₂.

For determination of cytotoxicity of the disinfectant solutions, eight parts by volume of solutions of disinfectant mixed with two parts by volume of water for injection, were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with ice-cold culture medium containing 2% FCS. 0.1 ml of each dilution was transferred, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established Vero monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytotoxic effect was read after 5 and 7 days in a 5% CO₂-atmosphere.

c) Elimination de la cytotoxicité du produit / *Elimination of cytotoxicity*

Les solutions d'essai du produit additionnées de 1/5^{ème} d'eau pour préparation injectable, sont filtrées sur colonne Microspin S-400 HR (GE Healthcare). Les filtrats sont ensuite dilués de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu DMEM à 2% de SVF glacé. 0,1 ml de chaque dilution est distribué dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établie de cellules Vero. Après une incubation d'une heure à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture DMEM 2% est ajouté aux puits. L'effet subcytotoxique est apprécié après une incubation de 5 et 7 jours à 37°C en présence de 5% de CO₂.

For elimination of cytotoxicity of the disinfectant solutions, eight parts by volume of solutions of disinfectant mixed with two parts by volume of water for injection, were filtrated on Microspin S-400 HR column (GE Healthcare). Then filtrates were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with ice-cold DMEM + 2% FCS. 0.1 ml of each dilution was transferred, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established Vero monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytotoxic effect was read after incubation during 5 and 7 days in a 5% CO₂-atmosphere.

d) Sensibilité des cellules au virus / *Cell sensitivity to virus*

Un titrage comparatif du virus est réalisé sur les cellules Vero traitées ou non par le désinfectant afin de tester la réduction de sensibilité des cellules au virus en présence du produit. 0,1 ml de la plus basse dilution en milieu de culture à 2% de SVF apparemment non cytotoxique du désinfectant ou de PBS dilué en milieu de culture à 2% de SVF est distribué dans 8 x 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établi de cellules Vero. Après 1 h à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de virus dilués de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu DMEM à 2% de SVF, est distribué en parallèle sur les cellules traitées ou non traitées. La lecture de l'effet cytopathogène (ECP) se fait après 5 et 7 jours d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂ et le titre viral est calculé.

A comparative virus titration is performed on Vero cells that have or have not been treated with the disinfectant to check the reduction of the cells sensitivity to the virus. 0.1 ml of the lowest apparently non-cytotoxic dilution of the disinfectant in culture medium containing 2% FCS or of PBS diluted in culture medium containing 2% FCS are distributed onto 8 x 6 wells of a 96 wells microtitre plate with an established Vero monolayer. After 1 h at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere, 0.1 ml of virus diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with culture medium containing 2% FCS was added on treated or untreated cells in parallel. The cytopathic effect (CPE) was read after incubation during 5 and 7 days at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere and the virus titer was calculated.

e) Mesure de l'activité virucide du produit / Determination of virucidal activity

Les essais de virucidie du produit consistent à mettre en contact 1 volume de suspension de virus avec 1 volume de substance interférente et 8 volumes de la solution d'essai. Après différents temps de contact à une température de 20°C +/- 1°C, un aliquote de mélange est prélevé et filtré sur colonne Microspin S-400 HR. La quantité de virus résiduel dans le filtrat a été évaluée par la technique de titrage sur cellule Vero.

L'activité virucide du produit test est mesurée en calculant la chute du titre viral obtenu après traitement par comparaison avec un témoin de titrage obtenu en absence de désinfectant. La différence est exprimée en facteur de réduction (FR).

To test the virucidal activity of the product 1 part by volume of virus was incubated at 20°C +/- 1°C with 1 part by volume of interfering substances and 8 parts by volume of the solution of disinfectant. After different time of contacts, an aliquot of mixture was taken and filtered on Microspin S-400 HR column. The quantity of residual virus in the filtrate was evaluated by titration on Vero cell.

The virucidal activity of the test disinfectant was evaluated by calculating the decrease in titre in comparison with the control titration without disinfectant. The difference is given as reduction factor (RF).

f) Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / Control of efficiency for suppression of disinfectant activity

Huit Volumes des solutions d'essai du produit sont additionnés à 1 volume de milieu de culture et 1 volume de substance interférente. Immédiatement après la préparation du mélange, au temps 0, 0,1ml du mélange sont filtrées sur colonne Microspin S-400 HR. Les filtrats additionnés de 1/10^{ème} de virus sont ensuite incubés pendant 30 min dans un bain de glace fondante. Puis les suspensions virales sont diluées de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu de culture glacé et la quantité de virus résiduel est évaluée par la technique de titrage sur cellule Vero.

Eight parts by volume of solutions of disinfectant are mixed with 1 part by volume of interfering substances and 1 part by volume of culture medium. Immediately after preparation of the mixture, at time 0, 0.1ml of the mixtures are filtered on Microspin S-400 HR column. Then nine parts by volume of the filtrates are mixed with one part by volume of virus and the mixtures are leaved in an ice bath for 30 min. Then the viral suspensions were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ in ice-cold culture medium and the quantity of residual virus was evaluated by titration on Vero cell.

g) Inactivation du virus au formaldéhyde à 0,7% (m/v) / *Inactivation of virus with 0.7% (w/v) formaldehyde*

La suspension de virus a été soumise à des essais virucides vis-à-vis du formaldéhyde à 0,7% (m/v) comme substance de référence pour l'inactivation virale afin de contrôler l'uniformité du comportement de notre souche virale aux agents chimiques au cours du temps.

Les essais consistent à mettre en contact 1 volume de suspension de virus avec 4 volumes de solution tamponnée au phosphate (PBS, Invitrogen, France) et 5 volumes de formaldéhyde à 1,4% (m/v). Après des temps de contact de 5 min, 15 min, 30 min et 60 min à une température de 20°C +/- 1°C, un aliquote de mélange est prélevé et filtré sur colonne Microspin S-400 HR. La quantité de virus résiduel dans le filtrat a été évaluée par la technique de titrage sur cellule Vero.

The suspension of virus was subjected to virucidal tests against 0.7% (w/v) formaldehyde solution as reference substance for viral inactivation in order to control the uniformity of the behaviour of our virus stock to the chemical agents during the time.

To test the virucidal activity 1 part by volume of virus was incubated with 4 parts by volume of phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen, France) and 5 parts by volume of 1.4% (w/v) formaldehyde. After incubation time of 5 min, 15 min, 30 min and 60 min at 20°C +/- 1°C, an aliquot of mixture was taken and filtered on Microspin S-400 HR column. The quantity of residual virus in the filtrate was evaluated by titration on Vero cell.

V- Résultats / Results

1) Détermination de la dilution subcytotoxique du produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** et du filtrat sur colonne Microspin / Determination of subcytotoxic dilution of product **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** and filtrate on Microspin column :

| Méthode / Method | Dilution subcytotoxique / subcytotoxic dilution | | | | |
|---|--|--|---|---|--|
| | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (80%) | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (50%) | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (5%) | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (0.1%) | Formaldéhyde (0,70%) / Formaldehyde (0.70%) |
| Technique par dilution / Dilution method | 1/10 000 | 1/5 000 | 1/500 | 1/50 | 1/10 000 |
| Filtration sur Microspin / Microspin filtration | 1/100 | 1/100 | 1/10 | 1/10 | 1/50 |

2) Evaluation de la sensibilité des cellules au produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** et au Formaldéhyde à 0,7% / Evaluation of Cell sensitivity to **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** and 0.7% Formaldehyde

| | Log ₁₀ DICT ₅₀ / Log ₁₀ TCID ₅₀ | |
|--|---|---|
| | DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% (80%) | Formaldéhyde (0,7%) / Formaldehyde (0.7%) |
| Cellules non traitées / Non treated cells | 7.16 | 7.16 |
| Cellules traitées / Treated cells | 7.00 | 7.16 |

3) Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / Control of efficiency for suppression of disinfectant activity

| Produit / Product | Concentration | Log ₁₀ DICT ₅₀ (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ (RF) |
|----------------------------------|---------------|--|
| Témoin virus / Virus control | n.a. | 6.00 |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 80% | 5.66* (0.34) |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 50% | 5.66* (0.34) |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 5% | 5.83 (0.17) |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 0.1% | 6.00 (0.00) |

Légende / legend :

FR/RF : Facteur de réduction (en log) / Reducing factor (log)

* : Arrêt de l'activité du produit sur colonne lavée avec une solution de SAB à 0,5%
/ Suppression of product activity on column washed with 0.5% BSA

4) Evaluation de l'effet virucide du produit DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%
4% / Evaluation of virucidal activity of DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% :

Tableau des résultats de virucidie du produit DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% en conditions de propreté sur la souche NIA-3 du virus de la Pseudorange Porcine (PRV)

Table on virucidal activity of DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% in clean conditions on Pseudorabies Virus (PRV) strain NIA-3

| Produit / Product | Concentration | Substance interférente / Interfering solution | Log ₁₀ DICT ₅₀ après xx min (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ after xx min (RF) | | | | >4 log réduction après xx min / >4 log reduction after xx min |
|----------------------------------|---------------|---|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|
| | | | 0 | 0.5 | 1.5 | 3 | |
| Témoin virus / Virus control | n.a. | PBS | 6.16 | n.t. | n.t. | 5.83 | n.a. |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 80% | | 1.50 ^(a) (4.66) | 1.50 ^(a) (4.66) | 1.50 ^(a) (4.66) | 1.50 ^(a) (4.66) | ≥0.5 min |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 50% | | 1.50 ^(a) (4.66) | 1.50 ^(a) (4.66) | 1.50 ^(a) (4.66) | 1.50 ^(a) (4.66) | ≥0.5 min |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 5% | | 0.66 (5.50) | 0.50 (5.66) | 0.50 (5.66) | 0.50 (5.66) | ≥0.5 min |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 0.1% | | 5.16 (1.00) | n.t. | n.t. | 3.33 (2.83) | >3 min |

Tableau des résultats de virucidie du Formaldéhyde 0,7% sur la souche
NIA-3 du virus de la Pseudorabies Porcine (PRV)

Table on virucidal activity of 0.7% Formaldehyde on Pseudorabies Virus (PRV) strain NIA-3

| Produit / Product | Concentration | Substance interférente / Interfering solution | Log ₁₀ DICT ₅₀ après xx min (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ after xx min (RF) | | | | | >4 log réduction après xx min / >4 log reduction after xx min |
|---------------------------------|---------------|--|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--|
| | | | <0.5 | 5 | 15 | 30 | 60 | |
| Témoin virus / Virus control | n.a. | PBS | 5.83 | n.t. | n.t. | n.t. | 5.83 | n.a. |
| Formaldéhyde / Formaldehyde | 0.7% | | 5.16 (0.67) | 4.66 (1.17) | 3.83 (2.00) | 2.50 (3.33) | 0.50 (5.33) | ≥60 min |

Légende / legend :

n.a. : non applicable / non applicable

n.t. : non soumis à l'essai / non tested

FR/RF : Facteur de réduction (en log) / Reducing factor (log)

^(a) : A cause de la toxicité cellulaire de la dilution 1/10 du mélange filtré le titre en virus apparaît supérieur. Le FR peut-être sous-estimé / Due to cellular toxicity of the dilution 1/10 of the filtered mixture, virus titer is higher. The RF may be underestimated.

VI- Conclusion / Conclusion

Le produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** est actif à la concentration de 80%, 50% et 5% après un temps de contact de 30 secondes, selon la norme NF EN 14476+A1, dans des conditions de propreté vis-à-vis de la souche de Pseudorange Porcine (PRV) NIA-3.

*Product **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** is active at the concentration of 80%, 50% and 5% after 30 seconds of exposure time, according to the standard NF EN 14476+A1, in clean conditions against the Pseudorabies Virus (PVR) strain NIA-3.*

Lille, le 12 août 2011

Responsable technique



Dr. P. E. LOBERT

Chef de Service

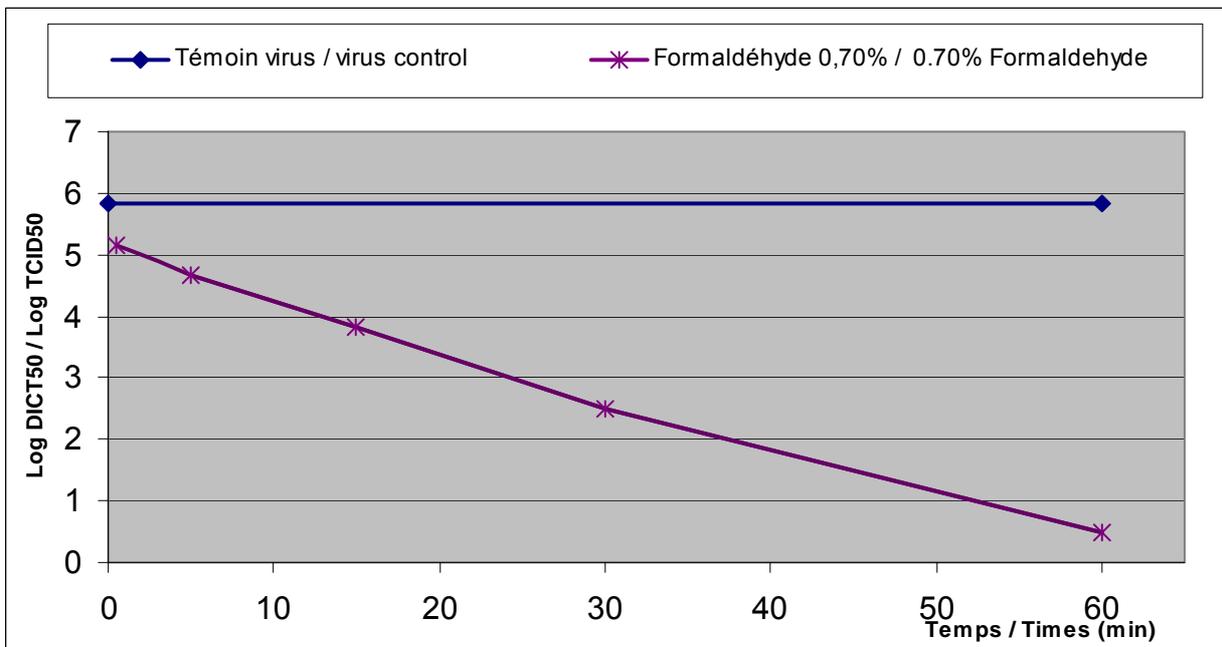
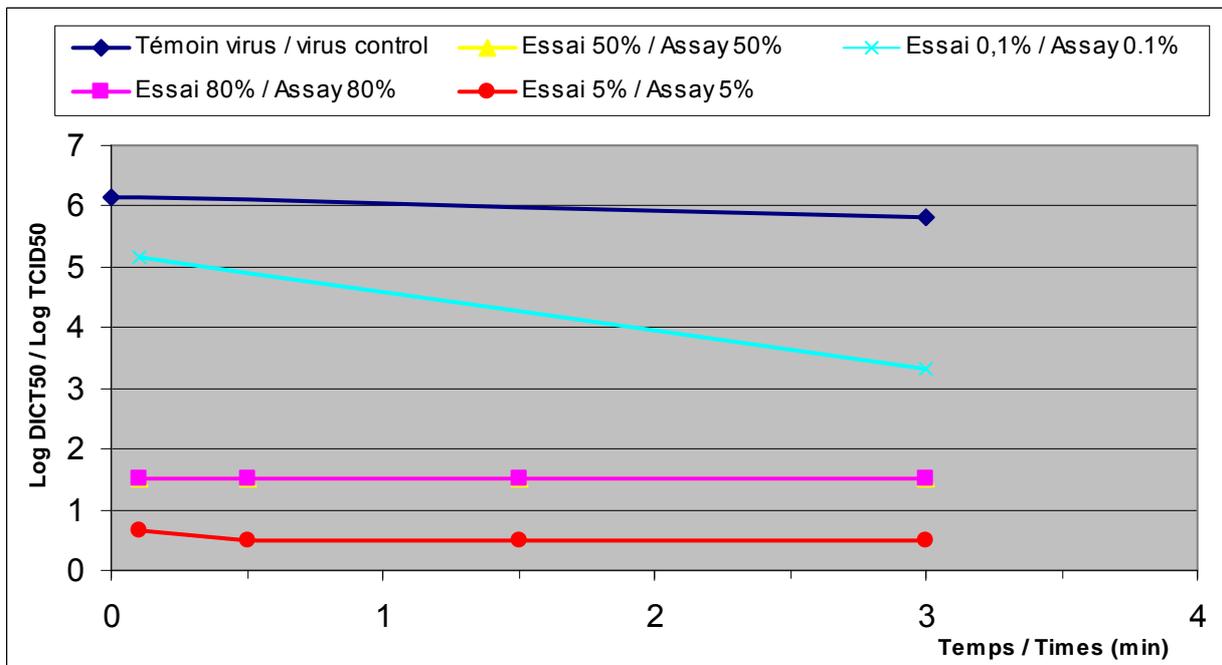


Pr. D. HOBER

Annexe 1 / Annex 1 :

Représentation graphique des résultats de virucidie du produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** en conditions de propreté vis-à-vis du Virus de la Pseudorange Porcine (PRV)

Figure of virucidal activity of *DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%* in clean conditions against the *Pseudorabies Virus (PRV)*



Laboratoire de Virologie – UPRES EA3610
CHRU de Lille – Université de Lille 2
Institut Hippocrate, Parc Eurasanté
152 rue du Dr Yersin
59120 Loos lez Lille
France
Tel : (33) 03.20.44.66.88/48.93/69.30
Fax : (33) 03.20.44.48.95
Email : didier.hober@chru-lille.fr

N° de rapport : 2011/27425
Date d'édition : 12/08/2011

**RAPPORT D'ESSAI
DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE
DU PRODUIT DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%**

**Selon la Norme NF EN 14476+A1 (Janvier 2007)
Vis à vis du Virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV)
(Substitut du Virus de l'Hépatite C)**

*EVALUATION OF THE
VIRUCIDAL EFFECT OF
DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%*

*Test method according to the standard NF EN 14476+A1 (January 2007)
Against Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV)
(Surrogate of Hepatitis C Virus)*

Rapport pour / Report submitted to:

**LABORATOIRES ANIOS
Pavé du moulin
59260 Lille Hellemmes
France**

Ce rapport d'essai ne concerne que le produit (cité ci-après) soumis à l'essai.
This trial report concerns only the product (quoted this later) subjected on approval

Ce document comporte 11 pages numérotées et 1 annexe
This report is made of 11 numbered pages and 1 annex

La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous la forme de fac-simile photographique
intégral

The reproduction of this trial report is authorized only under the shape of complete photographic reproduction

I- Introduction / Introduction

A la demande de la société ANIOS, le désinfectant **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** a été évalué pour ses propriétés inactivatrices contre la souche NADL du Virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV) comme virus modèle du Virus de l'Hépatite C (VHC). L'essai a été effectué selon la norme NF EN 14476+A1 : Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai virucide quantitatif de suspension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine – Janvier 2007.

*As requested by the ANIOS Society, the **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** disinfectant was evaluated for its virucidal inactivating properties against Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) strain NADL as a model virus to Hepatitis C Virus (HCV). The testing was carried out in accordance with the standard of NF EN 14476+A1: Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine – January 2007.*

II- Identification du produit / Identification of sample

- Nom du produit / *Name of the product* : DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%
- Fabricant / *Manufacturer* : Laboratoires ANIOS
- N° de lot – N° de formule / *Lot N° - Formula N°* : JO344 10 05
- Date de réception / *Date of receipt* : 15/06/11
- Application / *Use* : Lavage hygiénique et désinfection chirurgicale des mains / *Hygienic hands washing and surgical hands disinfection*
- Aspect du produit / *Appearance of product* : Liquide limpide et rose / *Clear and pink liquid*
- pH du produit / *pH Value* : Non Dilué (20°C) pH=5,40 / *Undiluted (20°C) pH=5.40*
- Conditions de stockage / *Conditions of storage* : Température ambiante, à l'abri de la lumière / *Room temperature in the dark*

III- Conditions expérimentales / Experimental conditions

- Période d'essai / *Period of analysis* : du 20/06/11 au 27/07/11 / *Through 20/06/11 to 27/07/11*
- Température d'essai / *Test temperature* : 20°C +/- 1°C
- Concentrations en produit testées / *Concentration of test product* : 80%, 50%, 5% et / *and 0.1%*
- Temps de contact / *Contact times* : 30 secondes / *seconds, 3 et / and 5 minutes*
- Diluant du produit / *Diluent of product* : Eau pour préparation injectable / *Water for injection*
- Substances interférentes / *Interfering substances* : Solution tamponnée au phosphate (PBS) / *Phosphate buffer saline (PBS)*
- Méthode pour stopper l'activité du produit / *Procedure to inactivate the product* : Gel filtration

IV- Matériel et Méthodes / Material and methods

1- Matériel / Material

a) Virus / Virus

La souche NADL du Virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV) (ATCC VR-534) a été fournie par la Société LGC Promochem (Molsheim, France)

Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) strain NADL (ATCC VR-534) was obtained from LGC Promochem (Molsheim, France).

b) Lignée cellulaire / Cell line

La lignée cellulaire MDBK (ATCC CCL-22) utilisée avec le Virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV) provient de l'European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France).

The MDBK cell line (ATCC CCL-22) used with the Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France).

2- Méthodes d'essai / Methods

a) Titrage viral / Determination of infectivity

Les suspensions virales traitées ou non traitées par le produit à tester sont diluées en série de 10^{-1} à 10^{-8} , dans du Milieu Minimum Essentiel de Eagle (EMEM, Invitrogen, France) avec 5% de sérum de cheval (SC, PAA Laboratoires, France) glacé. 0,1 ml de chaque dilution est ensuite transféré dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établi de cellules MDBK, en commençant par la dilution la plus élevée. Après une heure d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est additionné à chaque puits. La lecture de l'effet cytopathogène (ECP) se fait au microscope inversé après 5 et 7 jours d'incubation. Le calcul du titre de l'infectivité virale (\log_{10} DICT₅₀/ml) est déterminé par la méthode Spearman-Kärber.

The viral suspensions treated or non-treated with the product were diluted from 10^{-1} to 10^{-8} in ice-cold Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Invitrogen, France) containing 5% horse serum (HS, PAA Laboratories, France). 0.1 ml of each dilution was transferred, beginning with the highest dilution, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established MDBK monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytopathic effect (CPE) was read by using an inverted microscope after 5 and 7 days in a 5% CO₂-atmosphere. Calculation of estimated virus concentration (\log_{10} TCID₅₀/ml) was carried out by the Spearman-Kärber method.

b) Détermination de la concentration subcytotoxique du produit / *Determination of cytotoxicity of the product*

Les solutions d'essai du produit additionnées de 1/5^{ème} d'eau pour préparation injectable sont diluées de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu de culture à 5% de SC glacé. 0,1 ml de chaque dilution est distribué dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établi de cellules MDBK. Après une incubation d'une heure à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est ajouté aux puits. L'effet subcytotoxique est apprécié après une incubation de 5 et 7 jours en présence de 5% de CO₂.

For determination of cytotoxicity of the disinfectant solutions, eight parts by volume of solutions of disinfectant mixed with two parts by volume of water for injection, were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with ice-cold culture medium containing 5% HS. 0.1 ml of each dilution was transferred, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established MDBK monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytotoxic effect was read after 5 and 7 days in a 5% CO₂-atmosphere.

c) Elimination de la cytotoxicité du produit / *Elimination of cytotoxicity*

Les solutions d'essai du produit additionnées de 1/5^{ème} d'eau pour préparation injectable, sont filtrées sur colonne Microspin S-400 HR (GE Healthcare). Les filtrats sont ensuite dilués de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu de culture à 5% de SC glacé. 0,1 ml de chaque dilution est distribué dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établie de cellules MDBK. Après une incubation d'une heure à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est ajouté aux puits. L'effet subcytotoxique est apprécié après une incubation de 5 et 7 jours à 37°C en présence de 5% de CO₂.

For elimination of cytotoxicity of the disinfectant solutions, eight parts by volume of solutions of disinfectant mixed with two parts by volume of water for injection, were filtrated on Microspin S-400 HR column (GE Healthcare). Then filtrates were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with ice-cold culture medium + 5% HS. 0.1 ml of each dilution was transferred, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established MDBK monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytotoxic effect was read after incubation during 5 and 7 days in a 5% CO₂-atmosphere.

d) Sensibilité des cellules au virus / *Cell sensitivity to virus*

Un titrage comparatif du virus est réalisé sur les cellules traitées ou non par le désinfectant afin de tester la réduction de sensibilité des cellules au virus en présence du produit. 0,1 ml de la plus basse dilution en milieu de culture à 5% de SC apparemment non cytotoxique du désinfectant ou de PBS dilué en milieu de culture à 5% de SC est distribué dans 8 x 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établie de cellules MDBK. Après 1 h à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de virus dilués de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu de culture à 5% de SC, est distribué en parallèle sur les cellules traitées ou non traitées. La lecture de l'effet cytopathogène (ECP) se fait après 5 et 7 jours d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂ et le titre viral est calculé.

A comparative virus titration is performed on MDBK cells that have or have not been treated with the disinfectant to check the reduction of the cells sensitivity to the virus. 0.1 ml of the lowest apparently non-cytotoxic dilution of the disinfectant in culture medium containing 5% HS or of PBS diluted in culture medium containing 5% HS are distributed onto 8 x 6 wells of a 96 wells microtitre plate with an established MDBK monolayer. After 1 h at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere, 0.1 ml of virus diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with culture medium containing 5% HS was added on treated or untreated cells in parallel. The cytopathic effect (CPE) was read after incubation during 5 and 7 days at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere and the virus titer was calculated

e) Mesure de l'activité virucide du produit / Determination of virucidal activity

Les essais de virucidie du produit consistent à mettre en contact 1 volume de suspension de virus avec 1 volume de substance interférente et 8 volumes de la solution d'essai. Après différents temps de contact à une température de 20°C +/- 1°C, un aliquote de mélange est prélevé et filtré sur colonne Microspin S-400 HR. La quantité de virus résiduel dans le filtrat a été évaluée par la technique de titrage sur cellule MDBK.

L'activité virucide du produit test est mesurée en calculant la chute du titre viral obtenu après traitement par comparaison avec un témoin de titrage obtenu en absence de désinfectant. Le résultat est exprimé en facteur de réduction (FR).

To test the virucidal activity of the product 1 part by volume of virus was incubated at 20°C +/- 1°C with 1 part by volume of interfering substances and 8 parts by volume of the solution of disinfectant. After different incubation time, an aliquot of mixture was taken and filtered on Microspin S-400 HR column. The quantity of residual virus in the filtrate was evaluated by titration on MDBK cell.

The virucidal activity of the test disinfectant was evaluated by calculating the decrease in titre in comparison with the control titration without disinfectant. The results are expressed as reduction factor (RF).

f) Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / Control of efficiency for suppression of disinfectant activity

Huit Volumes des solutions d'essai du produit sont additionnés à 1 volume de milieu de culture et 1 volume de substance interférente. Immédiatement après la préparation du mélange, au temps 0, 0,1ml du mélange sont filtrées sur colonne Microspin S-400 HR. Les filtrats additionnés de 1/10^{ème} de virus sont ensuite incubés pendant 30 min dans un bain de glace fondante. Puis les suspensions virales sont diluées de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu de culture glacé et la quantité de virus résiduel est évaluée par la technique de titrage sur cellule MDBK.

Eight parts by volume of solutions of disinfectant are mixed with 1 part by volume of interfering substances and 1 part by volume of culture medium. Immediately after preparation of the mixture, at time 0, 0.1ml of the mixtures are filtered on Microspin S-400 HR column. Then nine parts by volume of the filtrates are mixed with one part by volume of virus and the mixtures are leaved in an ice bath for 30 min. Then the viral suspensions were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ in ice-cold culture medium and the quantity of residual virus was evaluated by titration on MDBK cell.

g) Inactivation du virus au formaldéhyde à 0,7% (m/v) / *Inactivation of virus with 0.7% (w/v) formaldehyde*

La suspension de virus a été soumise à des essais virucides vis-à-vis du formaldéhyde à 0,7% (m/v) comme substance de référence pour l'inactivation virale afin de contrôler l'uniformité du comportement de notre souche virale aux agents chimiques au cours du temps.

Les essais consistent à mettre en contact 1 volume de suspension de virus avec 4 volumes de solution tamponnée au phosphate (PBS, Invitrogen, France) et 5 volumes de formaldéhyde à 1,4% (m/v). Après des temps de contact de 5 min, 15 min, 30 min et 60 min à une température de 20°C +/- 1°C, un aliquote de mélange est prélevé et filtré sur colonne Microspin S-400 HR. La quantité de virus résiduel dans le filtrat a été évaluée par la technique de titrage sur cellule MDBK.

The suspension of virus was subjected to virucidal tests against 0.7% (w/v) formaldehyde solution as reference substance for viral inactivation in order to control the uniformity of the behaviour of our virus stock to the chemical agents during the time.

To test the virucidal activity 1 part by volume of virus was incubated with 4 parts by volume of phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen, France) and 5 parts by volume of 1.4% (w/v) formaldehyde. After incubation time of 5 min, 15 min, 30 min and 60 min at 20°C +/- 1°C, an aliquot of mixture was taken and filtered on Microspin S-400 HR column. The quantity of residual virus in the filtrate was evaluated by titration on MDBK cell.

V- Résultats / Results

1) Détermination de la dilution subcytotoxique du produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** et du filtrat sur colonne Microspin / Determination of subcytotoxic dilution of product **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** and filtrate on Microspin column :

| Méthode / Method | Dilution subcytotoxique / <i>subcytotoxic dilution</i> | | | | |
|--|--|--|---------------------------------------|---|--|
| | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (80%) | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (50%) | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (5%) | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (0.1%) | Formaldéhyde (0,70%) / Formaldehyde (0.70%) |
| Technique par dilution / <i>Dilution method</i> | 1/10 000 | 1/10 000 | 1/1 000 | 1/100 | 1/10 000 |
| Filtration sur Microspin / <i>Microspin filtration</i> | 1/100 | 1/100 | 1/10 | 1/10 | 1/50 |

2) Evaluation de la sensibilité des cellules au produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** et au Formaldéhyde à 0,7% / Evaluation of Cell sensitivity to **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** and 0.7% Formaldehyde

| | Log ₁₀ DICT ₅₀ / Log ₁₀ TCID ₅₀ | |
|--|---|--|
| | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (80%) | Formaldéhyde (0,70%) / Formaldehyde (0.70%) |
| Cellules non traitées / <i>Non treated cells</i> | 5.66 | 5.66 |
| Cellules traitées / <i>Treated cells</i> | 5.83 | 5.50 |

3) Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / Control of efficiency for suppression of disinfectant activity

| Produit / Product | Concentration | Log ₁₀ DICT ₅₀ (FR)/ Log ₁₀ TCID ₅₀ (RF) |
|----------------------------------|---------------|---|
| Témoin virus / Virus control | n.a. | 4.66 |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 80% | 4.50* (0.16) |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 50% | 4.50* (0.16) |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 5% | 4.66 (0.00) |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 0.1% | 4.83 (0.00) |

Légende / legend :

FR/RF : Facteur de réduction (en log) / Reducing factor (log)

* : Arrêt de l'activité du produit sur colonne lavée avec une solution de SAB à 0,5%
/ Suppression of product activity on column washed with 0.5% BSA

4) Evaluation de l'effet virucide du produit DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% / Evaluation of virucidal activity of *DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%* :

Tableau des résultats de virucidie du produit Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% en conditions de propreté sur la souche NADL du Virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV)

Table on virucidal activity of Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% in clean conditions on Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) strain NADL

| Produit / Product | Concentration | Substance interférente / Interfering solution | Log ₁₀ DICT ₅₀ après xx min (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ after xx min (RF) | | | | >4 log réduction après xx min / >4 log reduction after xx min |
|----------------------------------|---------------|---|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|
| | | | 0 | 0.5 | 3 | 5 | |
| Témoin virus / Virus control | n.a. | PBS | 5.83 | n.t. | n.t. | 5.50 | n.a. |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 80% | | 1.50 ^(a) (4.33) | 1.50 ^(a) (4.33) | 1.50 ^(a) (4.33) | 1.50 ^(a) (4.33) | ≥0.5 min |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 50% | | 3.00 (2.83) | 1.66 (4.16) | 1.16 (4.67) | 1.00 (4.83) | ≥0.5 min |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 5% | | 4.83 (1.00) | 4.66 (1.17) | 1.66 (4.17) | 0.50 (5.33) | ≥3 min |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 0.1% | | 5.16 (0.67) | n.t. | n.t. | 4.83 (1.00) | >5 min |

Tableau des résultats de virucidie du Formaldéhyde 0,7% sur la souche NADL du Virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV)

Table on virucidal activity of 0.7% Formaldehyde on Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) strain NADL

| Produit / Product | Concentration | Substance interférente / Interfering solution | Log ₁₀ DICT ₅₀ après xx min (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ after xx min (RF) | | | | | >4 log réduction après xx min / >4 log reduction after xx min |
|------------------------------|---------------|---|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| | | | <0.5 | 5 | 15 | 30 | 60 | |
| Témoin virus / Virus control | n.a. | PBS | 5.50 | n.t. | n.t. | n.t. | 5.33 | n.a. |
| Formaldéhyde / Formaldehyde | 0.7% | | 4.16 (1.34) | 2.16 (3.34) | 0.83 (4.67) | 0.50 (5.00) | 0.50 (5.00) | ≥15 min |

Légende / legend :

n.a. : non applicable / non applicable

n.t. : non soumis à l'essai / non tested

FR/RF : Facteur de réduction (en log) / Reducing factor (log)

^(a) : A cause de la toxicité cellulaire de la dilution 1/10 du mélange filtré le titre en virus apparaît supérieur. Le FR peut-être sous-estimé / Due to cellular toxicity of the dilution 1/10 of the filtered mixture, virus titer is higher. The RF may be underestimated.

VI- Conclusion / Conclusion

Le produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** est actif à la concentration de 80% et 50% après un temps de contact de 30 secondes, selon la norme NF EN 14476+A1, en conditions de propreté vis-à-vis de la souche NADL du Virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV).

Le produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** est actif à la concentration de 5% après un temps de contact de 3 minutes, selon la norme NF EN 14476+A1, en conditions de propreté vis-à-vis de la souche NADL du Virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV).

*Product **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** is active at the concentration of 80% and 50% after 30 seconds of exposure time, according to the standard NF EN 14476+A1, in clean conditions against the Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) strain NADL.*

*Product **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** is active at the concentration of 5% after 3 minutes of exposure time, according to the standard NF EN 14476+A1, in clean conditions against the Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) strain NADL.*

Lille, le 12 août 2011

Responsable technique



Dr. P. E. LOBERT

Chef de Service

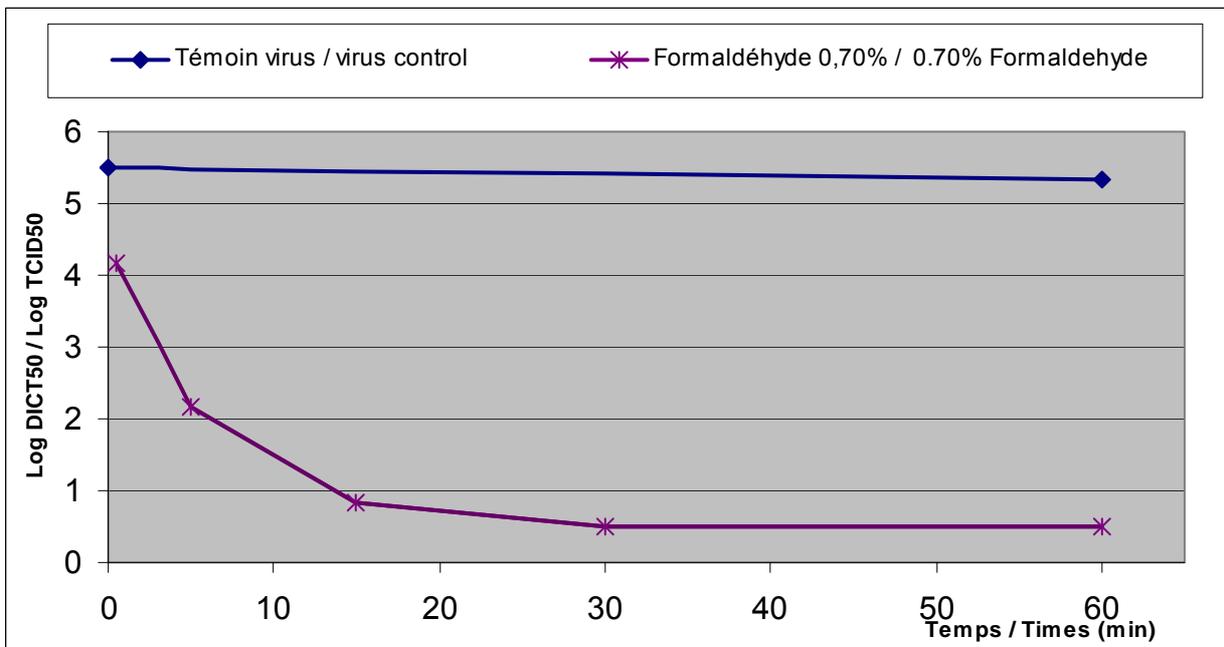
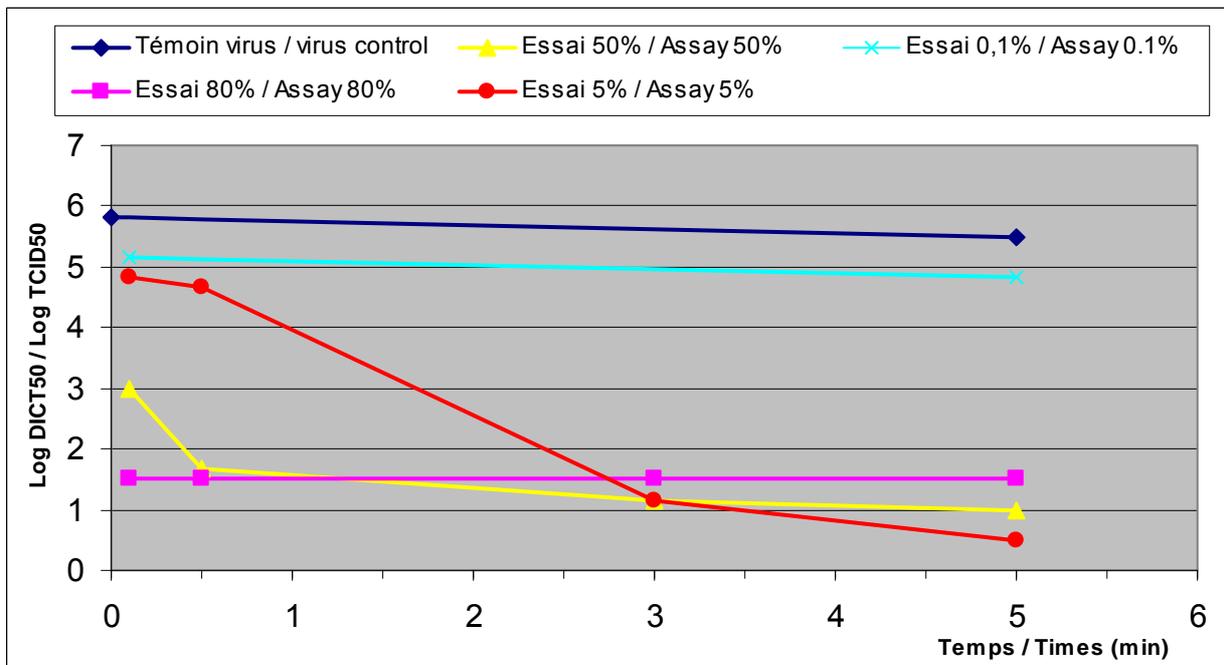


Pr. D. HOBBER

Annexe 1 / Annex 1 :

Représentation graphique des résultats de virucidie du produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** en conditions de propreté vis-à-vis du Virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV)

Figure of virucidal activity of **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** in clean conditions against the Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV)



Laboratoire de Virologie – UPRES EA3610
CHRU de Lille – Université de Lille 2
Institut Hippocrate, Parc Eurasanté
152 Rue du Dr Yersin
59120 Loos-Lez-Lille
France
Tel : (33) 03.20.44.66.88/ 48 93/ 69 30
Fax : (33) 03.20.44.48.95
Email : didier.hober@chru-lille.fr

N° de rapport : 2011/27426
Date d'édition : 12/08/2011

**RAPPORT D'ESSAI
DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE
DU PRODUIT DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%**

**Selon la Norme NF EN 14476+A1 (Janvier 2007)
Vis à vis de l'Herpesvirus Humain de type 1**

*EVALUATION OF THE
VIRUCIDAL EFFECT OF
DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%*

*Test method according to the standard NF EN 14476+A1 (January 2007)
Against Human Herpesvirus type 1*

Rapport pour / Report submitted to:

**LABORATOIRES ANIOS
Pavé du moulin
59260 Lille Hellemmes
France**

Ce rapport d'essai ne concerne que le produit (cité ci-après) soumis à l'essai.
This trial report concerns only the product (quoted this later) subjected on approval

Ce document comporte 11 pages numérotées et 1 annexe
This report is made of 11 numbered pages and 1 annex

La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous la forme de fac-simile photographique
intégral

The reproduction of this trial report is authorized only under the shape of complete photographic reproduction

I- Introduction / Introduction

A la demande de la société ANIOS, le désinfectant **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** a été évalué pour ses propriétés inactivatrices contre la souche HF de l'Herpesvirus Humain de type 1. L'essai a été effectué selon la norme NF EN 14476+A1 : Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai virucide quantitatif de suspension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine – Janvier 2007.

*As requested by the ANIOS Society, the **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** disinfectant was evaluated for its virucidal inactivating properties against Human Herpesvirus type 1 strain HF. The testing was carried out in accordance with the standard of NF EN 14476+A1: Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine – January 2007.*

II- Identification du produit / Identification of sample

- Nom du produit / *Name of the product* : Dermanios Scrub Chlorhexidine 4%
- Fabricant / *Manufacturer* : Laboratoires ANIOS
- N° de lot – N° de formule / *Lot N° - Formula N°* : JO344 10 05
- Date de réception / *Date of receipt* : 15/06/11
- Application / *Use* : Lavage hygiénique et désinfection chirurgicale des mains / *Hygienic hands washing and surgical hands disinfection*
- Aspect du produit / *Appearance of product* : Liquide limpide et rose / *Clear and pink liquid*
- pH du produit / *pH Value* : Non Dilué (20°C) pH=5,40 / *Undiluted (20°C) pH=5.40*
- Conditions de stockage / *Conditions of storage* : Température ambiante, à l'abri de la lumière / *Room temperature in the dark*

III- Conditions expérimentales / Experimental conditions

- Période d'essai / *Period of analysis* : du 15/06/11 au 05/07/11 / *Through 15/06/11 to 05/07/11*
- Température d'essai / *Test temperature* : 20°C +/- 1°C
- Concentrations en produit testées / *Concentration of test product* : 80%, 50%, 5% et / *and 0.1%*
- Temps de contact / *Contact times* : 30 secondes / *seconds, 1.5 et / and 3 minutes*
- Diluant du produit / *Diluent of product* : Eau pour préparation injectable / *Water for injection*
- Substances interférentes / *Interfering substances* : Solution tamponnée au phosphate (PBS) / *Phosphate buffer saline (PBS)*
- Méthode pour stopper l'activité du produit / *Procedure to inactivate the product* : Gel filtration

IV- Matériel et Méthodes / Material and methods

1- Matériel / Material

a) Virus / Virus

La souche HF de l'Herpesvirus Humain de type 1 (ATCC VR-260) a été fournie par la société LGC Promochem (Molsheim, France).

The Human Herpesvirus type 1 strain HF (ATCC VR-260) was obtained from LGC Promochem (Molsheim, France).

b) Lignée cellulaire / Cell line

La lignée cellulaire Vero (ATCC CCL-81) utilisée pour cultiver l'Herpesvirus Humain de type 1 provient de l'European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France).

The Vero cell line (ATCC CCL-81) used with the Human Herpesvirus type 1 was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France).

2- Méthodes d'essai / Methods

a) Titrage viral / Determination of infectivity

Les suspensions virales traitées ou non traitées par le produit à tester sont diluées en série de 10^{-1} à 10^{-8} , dans du Milieu MEM de Eagle modifié Dulbecco (DMEM, Invitrogen, France) avec 2% de sérum de veau foetal (SVF, Invitrogen, France) glacé. 0,1 ml de chaque dilution est ensuite transféré dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établi de cellules Vero, en commençant par la dilution la plus élevée. Après une heure d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est additionné à chaque puits. La lecture de l'effet cytopathogène (ECP) se fait au microscope inversé après 5 et 7 jours d'incubation. Le calcul du titre de l'infectivité virale (\log_{10} DICT₅₀/ml) est déterminé par la méthode Spearman-Kärber.

The viral suspensions treated or non-treated with the product were diluted from 10^{-1} to 10^{-8} in ice-cold Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, France) containing 2% fetal calf serum (FCS, Invitrogen, France). 0.1 ml of each dilution was transferred, beginning with the highest dilution, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established Vero monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytopathic effect (CPE) was read by using an inverted microscope after 5 and 7 days in a 5% CO₂-atmosphere. Calculation of estimated virus concentration (\log_{10} TCID₅₀/ml) was carried out by the Spearman-Kärber method.

b) Détermination de la concentration subcytotoxique du produit / *Determination of cytotoxicity of the product*

Les solutions d'essai du produit additionnées de 1/5^{ème} d'eau pour préparation injectable sont diluées de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu DMEM 2% SVF glacé. 0,1 ml de chaque dilution est distribué dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établi de cellules Vero. Après une incubation d'une heure à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est ajouté aux puits. L'effet subcytotoxique est apprécié après une incubation de 5 et 7 jours à 37°C en présence de 5% de CO₂.

For determination of cytotoxicity of the disinfectant solutions, eight parts by volume of solutions of disinfectant mixed with two parts by volume of water for injection, were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with ice-cold DMEM containing 2% FCS. 0.1 ml of each dilution was transferred, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established Vero monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytotoxic effect was read after 5 and 7 days at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere.

c) Elimination de la cytotoxicité du produit / *Elimination of cytotoxicity*

Les solutions d'essai du produit additionnées de 1/5^{ème} d'eau pour préparation injectable, sont filtrées sur colonne Microspin S-400 HR (GE Healthcare). Les filtrats sont ensuite dilués de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu DMEM à 2% de SVF glacé. 0,1 ml de chaque dilution est distribué dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établie de cellules Vero. Après une incubation d'une heure à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est ajouté aux puits. L'effet subcytotoxique est apprécié après une incubation de 5 et 7 jours à 37°C en présence de 5% de CO₂.

For elimination of cytotoxicity of the disinfectant solutions, eight parts by volume of solutions of disinfectant mixed with two parts by volume of water for injection, were filtrated on Microspin S-400 HR column (GE Healthcare). Then filtrates were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with ice-cold DMEM + 2% FCS. 0.1 ml of each dilution was transferred, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established Vero monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytotoxic effect was read after 5 and 7 days at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere.

d) Sensibilité des cellules au virus / *Cell sensitivity to virus*

Un titrage comparatif du virus est réalisé sur les cellules Vero traitées ou non par le désinfectant afin de tester la réduction de sensibilité des cellules au virus en présence du produit. 0,1 ml de la plus basse dilution en milieu DMEM à 2% de SVF apparemment non cytotoxique du désinfectant ou de PBS dilué en milieu DMEM à 2% de SVF est distribué dans 8 x 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établie de cellules Vero. Après 1 h à 37°C en présence de 5% de CO₂, le milieu de culture est éliminé des puits et 0,1 ml de virus dilués de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu de culture à 2% de SVF, est distribué en parallèle sur les cellules traitées ou non traitées. La lecture de l'effet cytopathogène (ECP) se fait après 5 et 7 jours d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂ et le titre viral est calculé.

A comparative virus titration is performed on Vero cells that have or have not been treated with the disinfectant to check the reduction of the cells sensitivity to the virus. 0.1 ml of the lowest apparently non-cytotoxic dilution of the disinfectant in DMEM + 2% FCS or of PBS diluted in DMEM + 2% FCS are distributed onto 8 x 6 wells of a 96 wells microtitre plate with an established Vero monolayer. After 1 h at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere, culture medium is removed from the wells and 0.1 ml of virus diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with culture medium + 2% FCS was added on treated or untreated cells in parallel. The cytopathic effect (CPE) was read after 5 and 7 days at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere and the virus titer was calculated.

e) Mesure de l'activité virucide du produit / Determination of virucidal activity

Les essais de virucidie du produit consistent à mettre en contact 1 volume de suspension de virus avec 1 volume de substance interférente et 8 volumes de la solution d'essai. Après différents temps de contact à une température de 20°C +/- 1°C, un aliquot de mélange est prélevé et filtré sur colonne Microspin S-400 HR. La quantité de virus résiduel dans le filtrat a été évaluée par la technique de titrage sur cellule Vero.

L'activité virucide du produit test est mesurée en calculant la chute du titre viral obtenu après traitement par comparaison avec un témoin de titrage obtenu en absence de désinfectant. Le résultat est exprimé en facteur de réduction (FR).

To test the virucidal activity of the product 1 part by volume of virus was incubated at 20°C +/- 1°C with 1 part by volume of interfering substances and 8 parts by volume of the solution of disinfectant. After different incubation time, an aliquot of mixture was taken and filtered on Microspin S-400 HR column. The quantity of residual virus in the filtrate was evaluated by titration on Vero cell.

The virucidal activity of the test disinfectant was evaluated by calculating the decrease in titre in comparison with the control titration without disinfectant. The results are expressed as reduction factor (RF).

f) Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / Control of efficiency for suppression of disinfectant activity

Huit Volumes des solutions d'essai du produit sont additionnés à 1 volume de milieu de culture et 1 volume de substance interférente. Immédiatement après la préparation du mélange, au temps 0, 0,1ml du mélange sont filtrées sur colonne Microspin S-400 HR. Les filtrats additionnés de 1/10^{ème} de virus sont ensuite incubés pendant 30 min dans un bain de glace fondante. Puis les suspensions virales sont diluées de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu de culture glacé et la quantité de virus résiduel est évaluée par la technique de titrage sur cellule Vero.

Eight parts by volume of solutions of disinfectant are mixed with 1 part by volume of interfering substances and 1 part by volume of culture medium. Immediately after preparation of the mixture, at time 0, 0.1ml of the mixtures are filtered on Microspin S-400 HR column. Then nine parts by volume of the filtrates are mixed with one part by volume of virus and the mixtures are leaved in an ice bath for 30 min. Then the viral suspensions were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ in ice-cold culture medium and the quantity of residual virus was evaluated by titration on Vero cell.

g) Inactivation du virus au formaldéhyde à 0,7% (m/v) / *Inactivation of virus with 0.7% (w/v) formaldehyde*

La suspension de virus a été soumise à des essais virucides vis-à-vis du formaldéhyde à 0,7% (m/v) comme substance de référence pour l'inactivation virale afin de contrôler l'uniformité du comportement de notre souche virale aux agents chimiques au cours du temps.

Les essais consistent à mettre en contact 1 volume de suspension de virus avec 4 volumes de solution tamponnée au phosphate (PBS, Invitrogen, France) et 5 volumes de formaldéhyde à 1,4% (m/v). Après des temps de contact de 5 min, 15 min, 30 min et 60 min à une température de 20°C +/- 1°C, un aliquote de mélange est prélevé et filtré sur colonne Microspin S-400 HR. La quantité de virus résiduel dans le filtrat a été évaluée par la technique de titrage sur cellule Vero.

The suspension of virus was subjected to virucidal tests against 0.7% (w/v) formaldehyde solution as reference substance for viral inactivation in order to control the uniformity of the behaviour of our virus stock to the chemical agents during the time.

To test the virucidal activity 1 part by volume of virus was incubated with 4 parts by volume of phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen, France) and 5 parts by volume of 1.4% (w/v) formaldehyde. After incubation time of 5 min, 15 min, 30 min and 60 min at 20°C +/- 1°C, an aliquot of mixture was taken and filtered on Microspin S-400 HR column. The quantity of residual virus in the filtrate was evaluated by titration on Vero cell.

V- Résultats / Results

1) Détermination de la dilution subcytotoxique du produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** et du filtrat sur colonne Microspin / Determination of subcytotoxic dilution of product **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** and filtrate on Microspin column :

| Méthode / Method | Dilution subcytotoxique / subcytotoxic dilution | | | | |
|---|---|--|---------------------------------------|---|---|
| | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (80%) | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (50%) | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (5%) | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (0.1%) | Formaldéhyde (0,70%) / Formaldehyde (0.70%) |
| Technique par dilution / Dilution method | 1/1 000 | 1/1 000 | 1/1 000 | 1/10 | 1/10 000 |
| Filtration sur Microspin / Microspin filtration | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/50 |

2) Evaluation de la sensibilité des cellules au virus suite au traitement par le produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** ou le Formaldéhyde à 0,7% / Evaluation of Cell sensitivity to virus after treatment with **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** or 0.7% Formaldehyde

| | Log ₁₀ DICT ₅₀ / Log ₁₀ TCID ₅₀ | |
|---|---|---|
| | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (80%) | Formaldéhyde (0,7%) / Formaldehyde (0.7%) |
| Cellules non traitées / Non treated cells | 7.66 | 7.66 |
| Cellules traitées / Treated cells | 7.33 | 7.50 |

3) Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / Control of efficiency for suppression of disinfectant activity

| Produit / Product | Concentration | Log ₁₀ DICT ₅₀ (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ (RF) |
|----------------------------------|---------------|--|
| Témoin virus / Virus control | n.a. | 5.50 |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 80% | 5.16* (0.34) |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 50% | 5.33* (0.17) |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 5% | 5.50 (0.00) |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 0.1% | 5.50 (0.00) |

Légende / legend :

FR/RF : Facteur de réduction (en log) / Reducing factor (log)

* : Arrêt de l'activité du produit sur colonne lavée avec une solution de SAB à 0,5%
/ Suppression of product activity on column washed with 0.5% BSA

4) Evaluation de l'effet virucide du produit DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% / Evaluation of virucidal activity of DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% :

Tableau des résultats de virucidie du produit DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% en conditions de propreté sur la souche HF de l'Herpesvirus Humain de type 1

Table on virucidal activity of DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% in clean conditions on Human Herpesvirus type 1 strain HF

| Produit / Product | Concentration | Substance interférente / Interfering solution | Log ₁₀ DICT ₅₀ après xx min (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ after xx min (RF) | | | | >4 log réduction après xx min / >4 log reduction after xx min |
|----------------------------------|---------------|---|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|
| | | | 0 | 0.5 | 1.5 | 3 | |
| Témoin virus / Virus control | n.a. | PBS | 5.83 | n.t. | n.t. | 5.66 | n.a. |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 80% | | 1.50 ^(a) (4.33) | 1.50 ^(a) (4.33) | 1.50 ^(a) (4.33) | 1.50 ^(a) (4.33) | ≥0.5 min |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 50% | | 1.50 ^(a) (4.33) | 1.50 ^(a) (4.33) | 1.50 ^(a) (4.33) | 1.50 ^(a) (4.33) | ≥0.5 min |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 5% | | 1.33 (4.50) | 0.50 (5.33) | 0.50 (5.33) | 0.50 (5.33) | ≥0.5 min |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 0.1% | | 5.66 (0.16) | n.t. | n.t. | 4.83 (1.00) | >3 min |

Tableau des résultats de virucidie du Formaldéhyde 0,7% sur la souche HF de l'Herpesvirus Humain de type 1

Table on virucidal activity of 0.7% Formaldehyde on Human Herpesvirus type 1 strain HF

| Produit / Product | Concentration | Substance interférente / Interfering solution | Log ₁₀ DICT ₅₀ après xx min (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ after xx min (RF) | | | | | >4 log réduction après xx min / >4 log reduction after xx min |
|------------------------------|---------------|---|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| | | | <0.5 | 5 | 15 | 30 | 60 | |
| Témoin virus / Virus control | n.a. | PBS | 5.83 | n.t. | n.t. | n.t. | 5.66 | n.a. |
| Formaldéhyde / Formaldehyde | 0.7% | | 5.00 (0.83) | 3.66 (2.17) | 2.66 (3.17) | 1.16 (4.67) | 0.50 (5.50) | ≥30 min |

Légende / legend :

n.a. : non applicable / non applicable

n.t. : non soumis à l'essai / non tested

FR/RF : Facteur de réduction (en log) / Reducing factor (log)

^(a) : A cause de la toxicité cellulaire de la dilution 1/10 du mélange filtré le titre en virus apparaît supérieur. Le FR peut-être sous-estimé / Due to cellular toxicity of the dilution 1/10 of the filtered mixture, virus titer is higher. The RF may be underestimated.

VI- Conclusion / Conclusion

Le produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** est actif à la concentration de 80%, 50% et 5% après un temps de contact de 30 secondes, selon la norme NF EN 14476+A1, dans des conditions de propreté vis-à-vis de la souche HF d'Herpesvirus humain de type 1.

*Product **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** is active at the concentration of 80%, 50% and 5% after 30 seconds of exposure time, according to the standard NF EN 14476+A1, in clean conditions against the Human Herpesvirus type 1 strain HF.*

Lille, le 12 août 2011

Responsable technique



Dr. P. E. LOBERT

Chef de Service

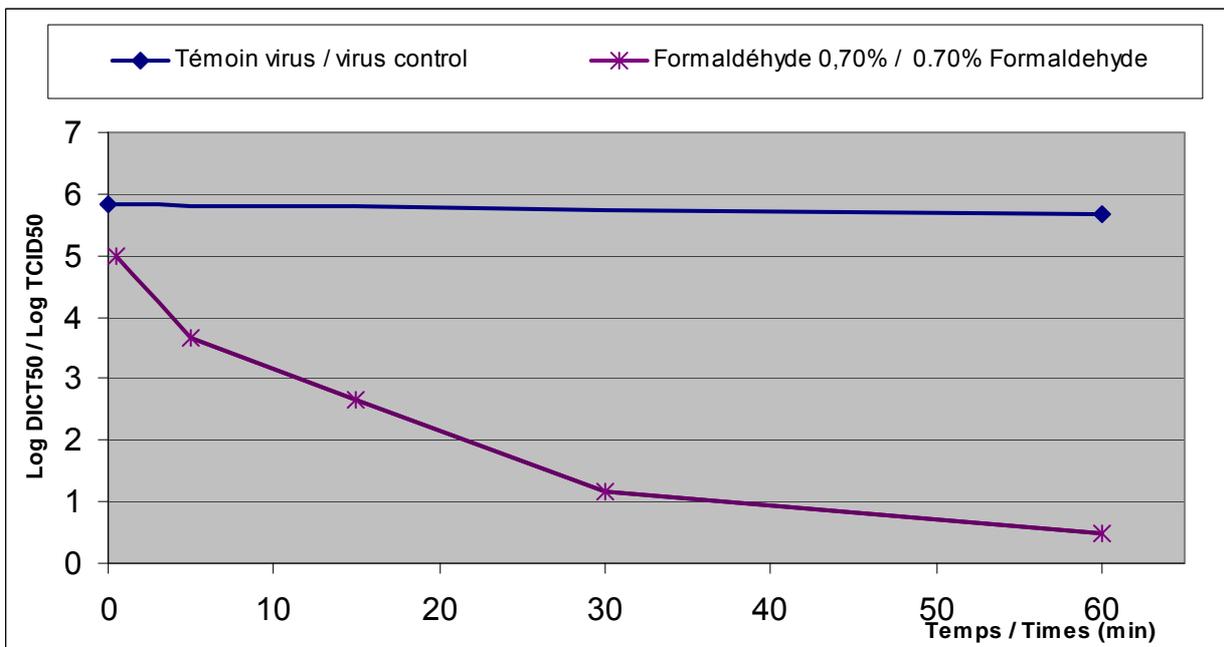
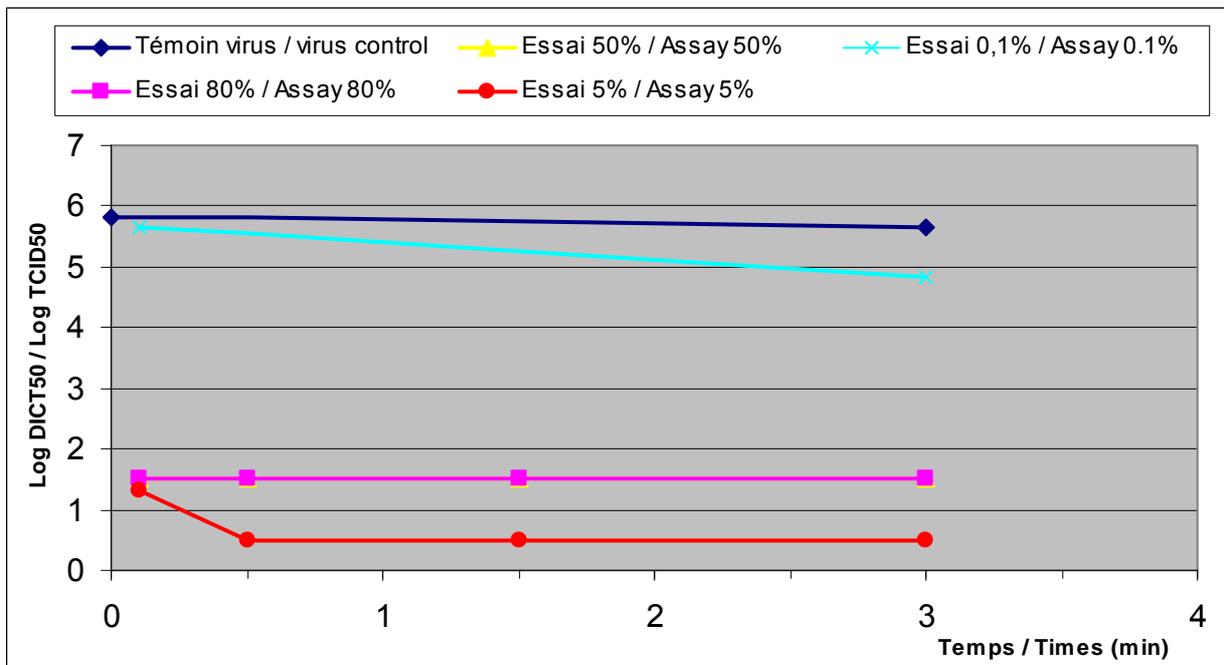


Pr. D. HOBER

Annexe 1 / Annex 1 :

Représentation graphique des résultats de virucidie de **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** en conditions de propreté vis-à-vis de l'Herpesvirus Humain de type 1

Figure of virucidal activity of *DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%* in clean conditions against the Human Herpevirus type 1



Laboratoire de Virologie – UPRES EA3610
CHRU de Lille – Université de Lille 2
Institut Hippocrate, Parc Eurasanté
59120 Loos
France
Tel : (33) 03.20.44.69.30
Fax : (33) 03.20.44.48.95
Email : dhober@chru-lille.fr

N° de rapport : 2011/27565
Date d'édition : 12/08/2011

**RAPPORT D'ESSAI
DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE
DU PRODUIT DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%**

**Selon la Norme NF EN 14476+A1 (Janvier 2007)
Vis à vis du Rotavirus SA-11**

*EVALUATION OF THE
VIRUCIDAL EFFECT OF
DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%*

*Test method according to the standard NF EN 14476+A1 (January 2007)
Against Rotavirus SA-11*

Rapport pour / Report submitted to:

**LABORATOIRES ANIOS
Pavé du moulin
59260 Lille Hellemmes
France**

Ce rapport d'essai ne concerne que le produit (cité ci-après) soumis à l'essai.
This trial report concerns only the product (quoted this later) subjected on approval

Ce document comporte 10 pages numérotées et 1 annexe
This report is made of 10 numbered pages and 1 annex

La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous la forme de fac-simile photographique
intégral

The reproduction of this trial report is authorized only under the shape of complete photographic reproduction

I- Introduction / Introduction

A la demande de la société ANIOS, le désinfectant **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** a été évalué pour ses propriétés inactivatrices contre la souche SA-11 de Rotavirus simien. L'essai a été effectué selon la norme NF EN 14476+A1 : Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai virucide quantitatif de suspension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine – Janvier 2007.

*As requested by the ANIOS Society, the **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** disinfectant was evaluated for its virucidal inactivating properties against Simian Rotavirus strain SA-11. The testing was carried out in accordance with the standard of NF EN 14476+A1: Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine – January 2007.*

II- Identification du produit / Identification of sample

- Nom du produit / *Name of the product* : Dermanios Scrub Chlorhexidine 4%
- Fabricant / *Manufacturer* : Laboratoires ANIOS
- N° de lot – N° de formule / *Lot N° - Formula N°* : JO344 10 05
- Date de réception / *Date of receipt* : 15/06/11
- Application / *Use* : Lavage hygiénique et désinfection chirurgicale des mains / *Hygienic hands washing and surgical hands disinfection*
- Aspect du produit / *Appearance of product* : Liquide limpide et rose / *Clear and pink liquid*
- pH du produit / *pH Value* : Non Dilué (20°C) pH=5,40 / *Undiluted (20°C) pH=5.40*
- Conditions de stockage / *Conditions of storage* : Température ambiante, à l'abri de la lumière / *Room temperature in the dark*

III- Conditions expérimentales / Experimental conditions

- Période d'essai / *Period of analysis* : du 01/07/11 au 27/07/11 / *Through 01/07/11 to 27/07/11*
- Température d'essai / *Test temperature* : 20°C +/- 1°C
- Concentrations en produit testées / *Concentration of test product* : 80%, 50% et / *and 5%*
- Temps de contact / *Contact times* : 30 secondes / *seconds, 1.5 et / and 3 minutes*
- Diluant du produit / *Diluent of product* : Eau pour préparation injectable / *Water for injection*
- Substances interférentes / *Interfering substances* : Solution tamponnée au phosphate (PBS) / *Phosphate buffer saline (PBS)*
- Méthode pour stopper l'activité du produit / *Procedure to inactivate the product* : Gel filtration

IV- Matériel et Méthodes / Material and methods

1- Matériel / Material

a) Virus / Virus

La souche SA-11 de Rotavirus Simien (ATCC VR-1565) a été fournie par la société LGC Promochem (Molsheim, France).

The Simian Rotavirus strain SA-11 (ATCC VR-1565) was obtained from LGC Promochem (Molsheim, France).

b) Lignée cellulaire / Cell line

La lignée cellulaire MA-104 utilisée avec le Rotavirus SA-11 provient de l'European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France).

The MA-104 cell line used with the simian Rotavirus SA-11 was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France).

2- Méthodes d'essai / Methods

a) Titrage viral / Determination of infectivity

Les suspensions virales traitées ou non traitées par le produit à tester sont diluées en série de 10^{-1} à 10^{-8} , dans du Milieu MEM de Eagle (EMEM, Invitrogen, France) glacé avec $1\mu\text{g/ml}$ de trypsine (Sigma, France). 0,1 ml de chaque dilution est ensuite transféré dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établi de cellules MA-104, en commençant par la dilution la plus élevée. Après une heure d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO_2 , 0,1 ml de milieu de culture est additionné à chaque puits. La lecture de l'effet cytopathogène (ECP) se fait au microscope inversé après 5 et 7 jours d'incubation. Le calcul du titre de l'infectivité virale (\log_{10} DICT₅₀/ml) est déterminé par la méthode Spearman-Karber.

The viral suspensions treated or non-treated with the product were diluted from 10^1 to 10^8 in ice-cold Eagle's Medium (EMEM, Invitrogen, France) containing $1\mu\text{g/ml}$ trypsin (Sigma, France). 0.1 ml of each dilution was transferred, beginning with the highest dilution, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established MA-104 monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO_2 -atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytopathic effect (CPE) was read by using an inverted microscope after 5 and 7 days in a 5% CO_2 -atmosphere. Calculation of estimated virus concentration (\log_{10} TCID₅₀/ml) was carried out by the Spearman-Karber method.

b) Détermination de la concentration subcytotoxique du produit / *Determination of cytotoxicity of the product*

Les solutions d'essai du produit additionnées de 1/5^{ème} d'eau pour préparation injectable sont diluées de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu EMEM glacé contenant 1µg/ml de trypsine. 0,1 ml de chaque dilution est distribué dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établi de cellules MA-104. Après une incubation d'une heure à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est ajouté aux puits. L'effet subcytotoxique est apprécié après une incubation de 5 et 7 jours à 37°C en présence de 5% de CO₂.

For determination of cytotoxicity of the disinfectant solutions, eight parts by volume of solutions of disinfectant mixed with two parts by volume of water for injection, were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with ice-cold EMEM containing 1µg/ml trypsin. 0.1 ml of each dilution was transferred, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established MA-104 monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytotoxic effect was read after 5 and 7 days at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere.

c) Elimination de la cytotoxicité du produit / *Elimination of cytotoxicity*

Les solutions d'essai du produit additionnées de 1/5^{ème} d'eau pour préparation injectable, sont filtrées sur colonne Microspin S-400 HR (GE Healthcare). Les filtrats sont ensuite dilués de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu EMEM glacé contenant 1µg/ml de trypsine. 0,1 ml de chaque dilution est distribué dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établie de cellules MA-104. Après une incubation d'une heure à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est ajouté aux puits. L'effet subcytotoxique est apprécié après une incubation de 5 et 7 jours à 37°C en présence de 5% de CO₂.

For elimination of cytotoxicity of the disinfectant solutions, eight parts by volume of solutions of disinfectant mixed with two parts by volume of water for injection, were filtrated on Microspin S-400 HR column (GE Healthcare). Then filtrates were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with ice-cold EMEM + 1µg/ml trypsin. 0.1 ml of each dilution was transferred, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established MA-104 monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytotoxic effect was read after 5 and 7 days at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere.

d) Sensibilité des cellules au virus / *Cell sensitivity to virus*

Un titrage comparatif du virus est réalisé sur les cellules MA-104 traitées ou non par le désinfectant afin de tester la réduction de sensibilité des cellules au virus en présence du produit. 0,1 ml de la plus basse dilution en milieu EMEM contenant 1µg/ml de trypsine apparemment non cytotoxique du désinfectant ou de PBS dilué en milieu EMEM contenant 1µg/ml de trypsine est distribué dans 8 x 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établie de cellules MA-104. Après 1 h à 37°C en présence de 5% de CO₂, le milieu de culture est éliminé des puits et 0,1 ml de virus dilués de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu de culture à 2% de SVF, est distribué en parallèle sur les cellules traitées ou non traitées. La lecture de l'effet cytopathogène (ECP) se fait après 5 et 7 jours d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂ et le titre viral est calculé.

A comparative virus titration is performed on MA-104 cells that have or have not been treated with the disinfectant to check the reduction of the cells sensitivity to the virus. 0.1 ml of the lowest apparently non-cytotoxic dilution of the disinfectant in EMEM + 1µg/ml trypsin or of PBS diluted in EMEM + 1µg/ml trypsin are distributed onto 8 x 6 wells of a 96 wells microtitre plate with an established MA-104 monolayer. After 1 h at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere, culture medium is removed from the wells and 0.1 ml of virus diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with culture medium + 1µg/ml trypsin was added on treated or untreated cells in parallel. The cytopathic effect (CPE) was read after 5 and 7 days at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere and the virus titer was calculated.

e) Mesure de l'activité virucide du produit / Determination of virucidal activity

Les essais de virucidie du produit consistent à mettre en contact 1 volume de suspension de virus avec 1 volume de substance interférente et 8 volumes de la solution d'essai. Après différents temps de contact à une température de 20°C +/- 1°C, un aliquot de mélange est prélevé et filtré sur colonne Microspin S-400 HR. La quantité de virus résiduel dans le filtrat a été évaluée par la technique de titrage sur cellule MA-104.

L'activité virucide du produit test est mesurée en calculant la chute du titre viral obtenu après traitement par comparaison avec un témoin de titrage obtenu en absence de désinfectant. Le résultat est exprimé en facteur de réduction (FR).

To test the virucidal activity of the product 1 part by volume of virus was incubated at 20°C +/- 1°C with 1 part by volume of interfering substances and 8 parts by volume of the solution of disinfectant. After different incubation time, an aliquot of mixture was taken and filtered on Microspin S-400 HR column. The quantity of residual virus in the filtrate was evaluated by titration on MA-104 cell.

The virucidal activity of the test disinfectant was evaluated by calculating the decrease in titre in comparison with the control titration without disinfectant. The results are expressed as reduction factor (RF).

f) Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / Control of efficiency for suppression of disinfectant activity

Huit Volumes des solutions d'essai du produit sont additionnés à 1 volume de milieu de culture et 1 volume de substance interférente. Immédiatement après la préparation du mélange, au temps 0, 0,1ml du mélange sont filtrées sur colonne Microspin S-400 HR. Les filtrats additionnés de 1/10^{ème} de virus sont ensuite incubés pendant 30 min dans un bain de glace fondante. Puis les suspensions virales sont diluées de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu de culture glacé et la quantité de virus résiduel est évaluée par la technique de titrage sur cellule MA-104.

Eight parts by volume of solutions of disinfectant are mixed with 1 part by volume of interfering substances and 1 part by volume of culture medium. Immediately after preparation of the mixture, at time 0, 0.1ml of the mixtures are filtered on Microspin S-400 HR column. Then nine parts by volume of the filtrates are mixed with one part by volume of virus and the mixtures are leaved in an ice bath for 30 min. Then the viral suspensions were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ in ice-cold culture medium and the quantity of residual virus was evaluated by titration on MA-104 cell.

g) Inactivation du virus au formaldéhyde à 0,7% (m/v) / *Inactivation of virus with 0.7% (w/v) formaldehyde*

La suspension de virus a été soumise à des essais virucides vis-à-vis du formaldéhyde à 0,7% (m/v) comme substance de référence pour l'inactivation virale afin de contrôler l'uniformité du comportement de notre souche virale aux agents chimiques au cours du temps.

Les essais consistent à mettre en contact 1 volume de suspension de virus avec 4 volumes de solution tamponnée au phosphate (PBS, Invitrogen, France) et 5 volumes de formaldéhyde à 1,4% (m/v). Après des temps de contact de 5 min, 15 min, 30 min et 60 min à une température de 20°C +/- 1°C, un aliquote de mélange est prélevé et filtré sur colonne Microspin S-400 HR. La quantité de virus résiduel dans le filtrat a été évaluée par la technique de titrage sur cellule MA-104.

The suspension of virus was subjected to virucidal tests against 0.7% (w/v) formaldehyde solution as reference substance for viral inactivation in order to control the uniformity of the behaviour of our virus stock to the chemical agents during the time.

To test the virucidal activity 1 part by volume of virus was incubated with 4 parts by volume of phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen, France) and 5 parts by volume of 1.4% (w/v) formaldehyde. After incubation time of 5 min, 15 min, 30 min and 60 min at 20°C +/- 1°C, an aliquot of mixture was taken and filtered on Microspin S-400 HR column. The quantity of residual virus in the filtrate was evaluated by titration on MA-104 cell.

V- Résultats / Results

- 1) Détermination de la dilution subcytotoxique du produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** et du filtrat sur colonne Microspin / *Determination of subcytotoxic dilution of product **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** and filtrate on Microspin column :*

| Méthode / Method | Dilution subcytotoxique / subcytotoxic dilution | | | |
|---|---|--|---------------------------------------|---|
| | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (80%) | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (50%) | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (5%) | Formaldéhyde (0,7%) / Formaldehyde (0.7%) |
| Technique par dilution / Dilution method | 1/10 000 | 1/10 000 | 1/1 000 | 1/10 000 |
| Filtration sur Microspin / Microspin filtration | 1/100 | 1/100 | 1/10 | 1/50 |

- 2) Evaluation de la sensibilité des cellules au virus suite au traitement par le produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** ou le Formaldéhyde à 0,7% / *Evaluation of Cell sensitivity to virus after treatment with **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** or 0.7% Formaldehyde*

| | Log ₁₀ DICT ₅₀ / Log ₁₀ TCID ₅₀ | |
|---|---|---|
| | DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% (80%) | Formaldéhyde (0,7%) / Formaldehyde (0.7%) |
| Cellules non traitées / Non treated cells | 7.16 | 7.16 |
| Cellules traitées / Treated cells | 7.33 | 7.33 |

3) Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / Control of efficiency for suppression of disinfectant activity

| Produit / Product | Concentration | Log ₁₀ DICT ₅₀ (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ (RF) |
|----------------------------------|---------------|--|
| Témoin virus / Virus control | n.a. | 6.33 |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 80% | 6.16* (0.17) |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 50% | 6.16 * (0.17) |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 5% | 6.33 (0.00) |

Légende / legend :

FR/RF : Facteur de réduction (en log) / Reducing factor (log)

* : Arrêt de l'activité du produit sur colonne lavée avec une solution de SAB à 0,5%
/ Suppression of product activity on column washed with 0.5% BSA

4) Evaluation de l'effet virucide du produit DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% / Evaluation of virucidal activity of DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% :

Tableau des résultats de virucidie du produit DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% en conditions de propreté sur la souche SA-11 de Rotavirus

Table on virucidal activity of DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% in clean conditions on Rotavirus strain SA-11

| Produit / Product | Concentration | Substance interférente / Interfering solution | Log ₁₀ DICT ₅₀ après xx min (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ after xx min (RF) | | | | >4 log réduction après xx min / >4 log reduction after xx min |
|----------------------------------|---------------|---|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|
| | | | 0 | 0.5 | 1.5 | 3 | |
| Témoin virus / Virus control | n.a. | PBS | 6.16 | n.t. | n.t. | 6.00 | n.a. |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 80% | | 3.33 (2.83) | 2.00 ^(a) (4.16) | 1.66 ^(a) (4.50) | 1.50 ^(a) (4.66) | ≥0.5 min |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 50% | | 4.16 (2.00) | 4.00 (2.16) | 2.00 ^(a) (4.16) | 1.50 ^(a) (4.66) | ≥1.5 min |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 5% | | 6.16 (0.00) | 5.83 (0.67) | 5.66 (0.50) | 5.00 (1.16) | >3 min |

Tableau des résultats de virucidie du Formaldéhyde 0,7% sur la souche SA-11 de Rotavirus

Table on virucidal activity of 0.7% Formaldehyde on Rotavirus strain SA-11

| Produit / Product | Concentration | Substance interférente / Interfering solution | Log ₁₀ DICT ₅₀ après xx min (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ after xx min (RF) | | | | | >4 log réduction après xx min / >4 log reduction after xx min |
|------------------------------|---------------|---|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| | | | 0 | 5 | 15 | 30 | 60 | |
| Témoin virus / Virus control | n.a. | PBS | 5.83 | n.t. | n.t. | n.t. | 5.83 | n.a. |
| Formaldéhyde / Formaldehyde | 0.7% | PBS | 6.00 (0.00) | 5.66 (0.17) | 4.83 (1.00) | 4.00 (1.83) | 3.33 (2.50) | >60 min |

Légende / legend :

n.a. : non applicable / non applicable

n.t. : non soumis à l'essai / non tested

FR/RF : Facteur de réduction (en log) / Reducing factor (log)

^(a) : A cause de la toxicité cellulaire de la dilution 1/10 du mélange filtré le titre en virus apparaît supérieur. Le FR peut-être sous-estimé / Due to cellular toxicity of the dilution 1/10 of the filtered mixture, virus titer is higher. The RF may be underestimated.

VI- Conclusion / Conclusion

Le produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** est actif à la concentration de 80% après un temps de contact de 30 secondes, selon la norme NF EN 14476+A1, dans des conditions de propreté vis-à-vis de la souche SA-11 de Rotavirus.

Le produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** est actif à la concentration de 50% après un temps de contact de 1,5 minutes, selon la norme NF EN 14476+A1, dans des conditions de propreté vis-à-vis de la souche SA-11 de Rotavirus.

*Product **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** is active at the concentration of 80% after 30 seconds of exposure time, according to the standard NF EN 14476+A1, in clean conditions against the Rotavirus strain SA-11.*

*Product **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** is active at the concentration of 50% after 1.5 minutes of exposure time, according to the standard NF EN 14476+A1, in clean conditions against the Rotavirus strain SA-11.*

Lille, le 12 août 2011

Responsable technique



Dr. P. E. LOBERT

Chef de Service

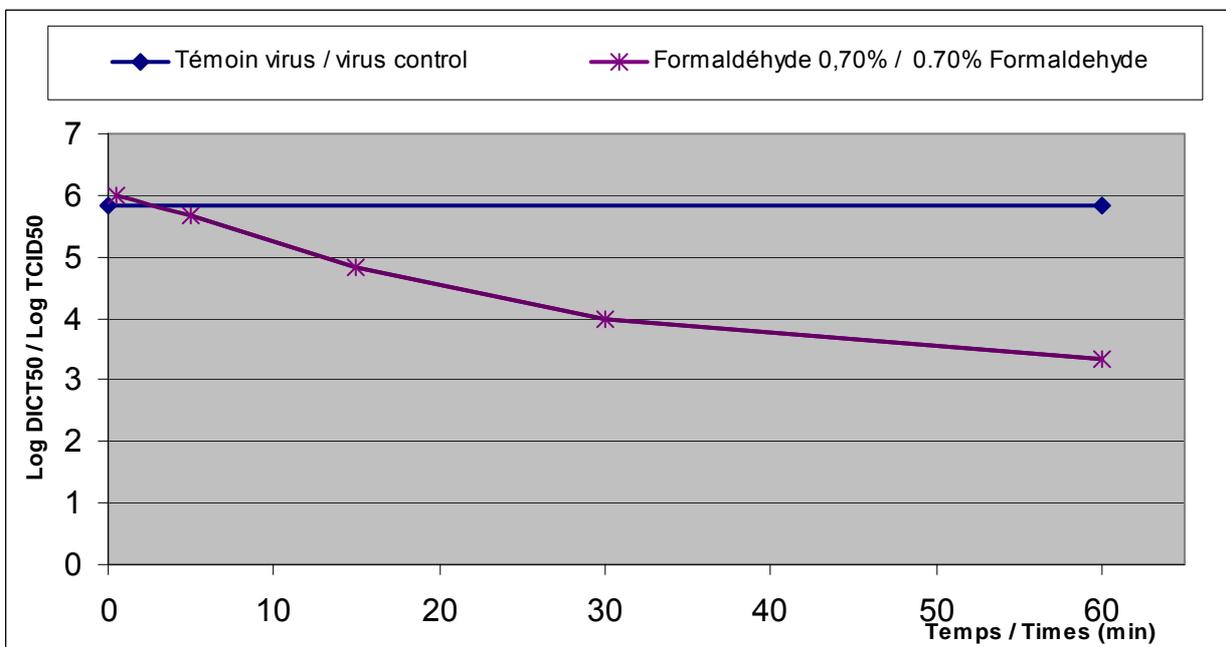
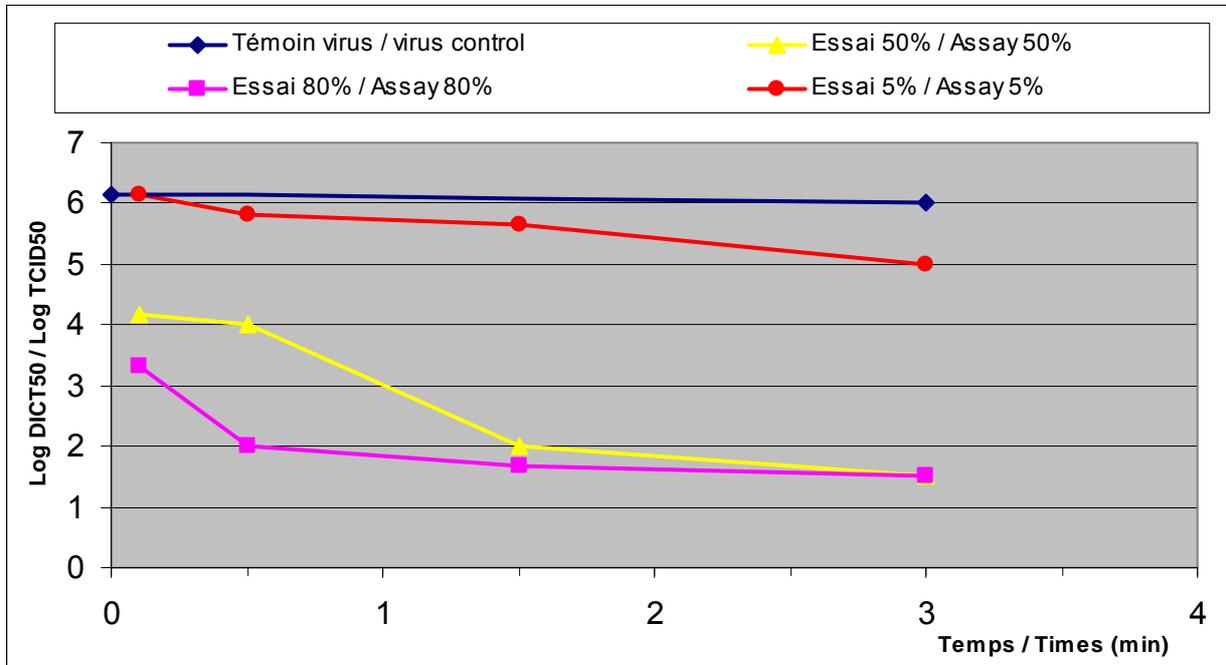


Pr. D. HOBBER

Annexe 1 / Annex 1 :

Représentation graphique des résultats de virucidie du produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** en conditions de propreté vis-à-vis du Rotavirus

Figure of virucidal activity of *DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%* in clean conditions against *Rotavirus*





Centre Hospitalier Régional
Universitaire de Lille



Laboratoire de Virologie – UPRES EA3610
CHRU de Lille – Université de Lille 2
Institut Hippocrate, Parc Eurasanté
152 rue du Dr Yersin
59120 Loos lez Lille
France
Tel : (33) 03.20.44.66.88/48.93/69.30
Fax : (33) 03.20.44.48.95
Email : didier.hober@chru-lille.fr

N° de rapport : 2011/28002
Date d'édition : 13/02/2012

**RAPPORT D'ESSAI
DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE
DU PRODUIT DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%**

**Selon la Norme NF EN 14476+A1 (Janvier 2007)
Vis à vis du Virus Respiratoire Syncytial (VRS)**

**EVALUATION OF THE
VIRUCIDAL EFFECT OF
DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%**

**Test method according to the standard NF EN 14476+A1 (January 2007)
Against Respiratory Syncytial Virus (RSV)**

Rapport pour / Report submitted to:

**LABORATOIRES ANIOS
Pavé du Moulin
59260 Hellemmes (Lille)
France**

Ce rapport d'essai ne concerne que le produit (cité ci-après) soumis à l'essai.
This trial report concerns only the product (quoted this later) subjected on approval

Ce document comporte 11 pages numérotées et 1 annexe
This report is made of 11 numbered pages and 1 annex

La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous la forme de fac-simile photographique
intégral

The reproduction of this trial report is authorized only under the shape of complete photographic reproduction

I- Introduction / Introduction

A la demande de la société ANIOS, le désinfectant **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** a été évalué pour ses propriétés inactivatrices contre une souche clinique du Virus Respiratoire Syncytial (VRS). L'essai a été effectué selon la norme NF EN 14476+A1 : Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai virucide quantitatif de suspension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine – Janvier 2007.

*As requested by the ANIOS Society, the **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** disinfectant was evaluated for its virucidal inactivating properties against Respiratory Syncytial Virus (RSV) a clinical strain. The testing was carried out in accordance with the standard of NF EN 14476+A1: Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine – January 2007.*

II- Identification du produit / Identification of sample

- Nom du produit / *Name of the product* : Dermanios Scrub Chlorhexidine 4%
- Fabricant / *Manufacturer* : Laboratoires ANIOS
- N° de lot – N° de formule / *Lot N° - Formula N°* : JO344 10 05
- Date de réception / *Date of receipt* : 15/06/11
- Application / *Use* : Nettoyage et désinfection des mains / *Washing and disinfection of hands*
- Aspect du produit / *Appearance of product* : Liquide limpide et rose / *Clear and pink liquid*
- pH du produit / *pH Value* : Non Dilué (20°C) pH=5,40 / *Undiluted (20°C) pH=5.40*
- Conditions de stockage / *Conditions of storage* : Température ambiante, à l'abri de la lumière / *Room temperature in the dark*

III- Conditions expérimentales / Experimental conditions

- Période d'essai / *Period of analysis* : du 28/09/11 au 29/12/11 / *Through 28/09/11 to 29/12/11*
- Température d'essai / *Test temperature* : 20°C +/- 1°C
- Concentrations en produit testées / *Concentration of test product* : 80%, 50%, 5% et / *and 0.1%*
- Temps de contact / *Contact times* : 30 secondes / *seconds, 1.5 et / and 3 minutes*
- Diluant du produit / *Diluent of product* : Eau pour préparation injectable / *Water for injection*
- Substances interférentes / *Interfering substances* : Solution tamponnée au phosphate (PBS) / *Phosphate buffer saline (PBS)*
- Méthode pour stopper l'activité du produit / *Procedure to inactivate the product* : Gel filtration

IV- Matériel et Méthodes / Material and methods

1- Matériel / Material

a) Virus / Virus

La souche clinique du Virus Respiratoire Syncytial (VRS) est une souche fournie par le laboratoire de virologie du CHRU de Lille (Pr Didier Hober) (France)

Respiratory Syncytial Virus (RSV) is a clinical strain supplied by the laboratory of virology (Pr Didier Hober), CHRU of Lille (France).

b) Lignée cellulaire / Cell line

La lignée cellulaire Hep-2 (ATCC CCL-23) utilisée avec le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) provient de l'European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France).

The Hep-2 cell line (ATCC CCL-23) used with the Respiratory Syncytial Virus (VRS) was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France).

2- Méthodes d'essai / Methods

a) Titrage viral / Determination of infectivity

Les suspensions virales traitées ou non traitées par le produit à tester sont diluées en série de 10^{-1} à 10^{-8} , dans du Milieu Minimum Essentiel de Eagle (MEM, Invitrogen, France) avec 2% de Sérum de Veau Fœtal (Gibco). 0,1 ml de chaque dilution est ensuite transféré dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établi de cellules Hep-2, en commençant par la dilution la plus élevée. Après une heure d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est additionné à chaque puits. La lecture de l'effet cytopathogène (ECP) se fait au microscope inversé après 10 et 12 jours d'incubation. Le calcul du titre de l'infectivité virale (\log_{10} DICT₅₀/ml) est déterminé par la méthode Spearman-Kärber.

The viral suspensions treated or non-treated with the product were diluted from 10^{-1} to 10^{-8} in ice-cold Eagle's Minimum Essential Medium (MEM, Invitrogen, France) containing 2% fetal bovin serum (Gibco). 0.1 ml of each dilution was transferred, beginning with the highest dilution, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established Hep-2 monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytopathic effect (CPE) was read by using an inverted microscope after 10 and 12 days in a 5% CO₂-atmosphere. Calculation of estimated virus concentration (\log_{10} TCID₅₀/ml) was carried out by the Spearman-Kärber method.

b) Détermination de la concentration subcytotoxique du produit / *Determination of cytotoxicity of the product*

Les solutions d'essai du produit additionnées de 1/5^{ème} d'eau pour préparation injectable sont diluées de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu de culture à 2% de SVF. 0,1 ml de chaque dilution est distribué dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établi de cellules Hep-2. Après une incubation d'une heure à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est ajouté aux puits. L'effet subcytotoxique est apprécié après une incubation de 5 et 7 jours en présence de 5% de CO₂.

For determination of cytotoxicity of the disinfectant solutions, eight parts by volume of solutions of disinfectant mixed with two parts by volume of water for injection, were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with culture medium containing 2% Fetal Calf serum. 0.1 ml of each dilution was transferred, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established Hep-2 monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytotoxic effect was read after 5 and 7 days in a 5% CO₂-atmosphere.

c) Elimination de la cytotoxicité du produit / *Elimination of cytotoxicity*

Les solutions d'essai du produit additionnées de 1/5^{ème} d'eau pour préparation injectable, sont filtrées sur colonne Microspin S-400 HR (GE Healthcare). Les filtrats sont ensuite dilués de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu de culture à 2% de SVF. 0,1 ml de chaque dilution est distribué dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établie de cellules Hep-2. Après une incubation d'une heure à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est ajouté aux puits. L'effet subcytotoxique est apprécié après une incubation de 5 et 7 jours à 37°C en présence de 5% de CO₂.

For elimination of cytotoxicity of the disinfectant solutions, eight parts by volume of solutions of disinfectant mixed with two parts by volume of water for injection, were filtrated on Microspin S-400 HR column (GE Healthcare). Then filtrates were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with ice-cold culture medium + 2% Fetal Calf serum. 0.1 ml of each dilution was transferred, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established Hep-2 monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytotoxic effect was read after incubation during 5 and 7 days in a 5% CO₂-atmosphere.

d) Sensibilité des cellules au virus / *Cell sensitivity to virus*

Un titrage comparatif du virus est réalisé sur les cellules traitées ou non par le désinfectant afin de tester la réduction de sensibilité des cellules au virus en présence du produit. 0,1 ml de la plus basse dilution en milieu de culture à 2% de SVF apparemment non cytotoxique du désinfectant ou de PBS dilué en milieu de culture à 2% de SVF est distribué dans 8 x 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établie de cellules Hep-2. Après 1 h à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de virus dilués de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu de culture à 2% de SVF, est distribué en parallèle sur les cellules traitées ou non traitées. La lecture de l'effet cytopathogène (ECP) se fait après 10 et 12 jours d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂ et le titre viral est calculé.

A comparative virus titration is performed on Hep-2 cells that have or have not been treated with the disinfectant to check the reduction of the cells sensitivity to the virus. 0.1 ml of the lowest apparently non-cytotoxic dilution of the disinfectant in culture medium containing 2% Fetal Calf serum or of PBS diluted in culture medium containing 2% Fetal Calf serum are distributed onto 8 x 6 wells of a 96 wells microtitre plate with an established Hep-2 monolayer. After 1 h at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere, 0.1 ml of virus diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with culture medium containing 2% Fetal Calf serum was added on treated or untreated cells in parallel. The cytopathic effect (CPE) was read after incubation during 10 and 12 days at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere and the virus titer was calculated

e) *Mesure de l'activité virucide du produit / Determination of virucidal activity*

Les essais de virucidie du produit consistent à mettre en contact 1 volume de suspension de virus avec 1 volume de substance interférente et 8 volumes de la solution d'essai. Après différents temps de contact à température ambiante, un aliquote de mélange est prélevé et filtré sur colonne Microspin S-400 HR. La quantité de virus résiduel dans le filtrat a été évaluée par la technique de titrage sur cellule Hep-2.

L'activité virucide du produit test est mesurée en calculant la chute du titre viral obtenu après traitement par comparaison avec un témoin de titrage obtenu en absence de désinfectant. Le résultat est exprimé en facteur de réduction (FR).

To test the virucidal activity of the product 1 part by volume of virus was incubated at room temperature with 1 part by volume of interfering substances and 8 parts by volume of the solution of disinfectant. After different incubation time, an aliquot of mixture was taken and filtered on Microspin S-400 HR column. The quantity of residual virus in the filtrate was evaluated by titration on Hep-2 cell.

The virucidal activity of the test disinfectant was evaluated by calculating the decrease in titre in comparison with the control titration without disinfectant. The results are expressed as reduction factor (RF).

f) *Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / Control of efficiency for suppression of disinfectant activity*

Huit Volumes des solutions d'essai du produit sont additionnés à 1 volume de milieu de culture et 1 volume de substance interférente. Immédiatement après la préparation du mélange, au temps 0, 0,1ml du mélange sont filtrées sur colonne Microspin S-400 HR. Les filtrats additionnés de 1/10^{ème} de virus sont ensuite incubés pendant 30 min dans un bain de glace fondante. Puis les suspensions virales sont diluées de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu de culture glacé et la quantité de virus résiduel est évaluée par la technique de titrage sur cellule Hep-2.

Eight parts by volume of solutions of disinfectant are mixed with 1 part by volume of interfering substances and 1 part by volume of culture medium. Immediately after preparation of the mixture, at time 0, 0.1ml of the mixtures are filtered on Microspin S-400 HR column. Then nine parts by volume of the filtrates are mixed with one part by volume of virus and the mixtures are leaved in an ice bath for 30 min. Then the viral suspensions were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ in ice-cold culture medium and the quantity of residual virus was evaluated by titration on Hep-2 cell.

g) Inactivation du virus au formaldéhyde à 0,7% (m/v) / *Inactivation of virus with 0.7% (w/v) formaldehyde*

La suspension de virus a été soumise à des essais virucides vis-à-vis du formaldéhyde à 0,7% (m/v) comme substance de référence pour l'inactivation virale afin de contrôler l'uniformité du comportement de notre souche virale aux agents chimiques au cours du temps.

Les essais consistent à mettre en contact 1 volume de suspension de virus avec 4 volumes de solution tamponnée au phosphate (PBS, Invitrogen, France) et 5 volumes de formaldéhyde à 1,4% (m/v). Après des temps de contact de 5 min, 15 min, 30 min et 60 min à une température de 20°C +/- 1°C, un aliquote de mélange est prélevé et filtré sur colonne Microspin S-400 HR. La quantité de virus résiduel dans le filtrat a été évaluée par la technique de titrage sur cellule MDBK.

The suspension of virus was subjected to virucidal tests against 0.7% (w/v) formaldehyde solution as reference substance for viral inactivation in order to control the uniformity of the behaviour of our virus stock to the chemical agents during the time.

To test the virucidal activity 1 part by volume of virus was incubated with 4 parts by volume of phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen, France) and 5 parts by volume of 1.4% (w/v) formaldehyde. After incubation time of 5 min, 15 min, 30 min and 60 min at 20°C +/- 1°C, an aliquot of mixture was taken and filtered on Microspin S-400 HR column. The quantity of residual virus in the filtrate was evaluated by titration on MDBK cell.

V- Résultats / Results

1) Détermination de la dilution subcytotoxique du produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** et du filtrat sur colonne Microspin / Determination of subcytotoxic dilution of product **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** and filtrate on Microspin column :

| Méthode / Method | Dilution subcytotoxique / <i>subcytotoxic dilution</i> | | | | |
|--|--|--|---|---|--|
| | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (80%) | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (50%) | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (5%) | Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% (0.1%) | Formaldéhyde (0,70%) / Formaldehyde (0.70%) |
| Technique par dilution / <i>Dilution method</i> | 1/10 000 | 1/10 000 | 1/1 000 | 1/500 | 1/10 000 |
| Filtration sur Microspin / <i>Microspin filtration</i> | 1/100 | 1/100 | 1/10 | 1/10 | 1/50 |

2) Evaluation de la sensibilité des cellules au virus suite au traitement par le produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** ou le Formaldéhyde à 0,7% / Evaluation of Cell sensitivity to virus after treatment with **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** or 0.7% Formaldehyde

| | Log ₁₀ DICT ₅₀ / Log ₁₀ TCID ₅₀ | |
|---|---|---|
| | DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% (80%) | Formaldéhyde (0,70%) / Formaldehyde (0.70%) |
| Cellules non traitées / <i>Non treated cells</i> | 6.50 | 6.50 |
| Cellules traitées / <i>Treated cells</i> | 6.16 | 6.33 |

3) Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / Control of efficiency for suppression of disinfectant activity

| Produit / Product | Concentration | Log ₁₀ DICT ₅₀ (FR)/ Log ₁₀ TCID ₅₀ (RF) |
|-------------------------------------|---------------|---|
| Témoin virus / Virus control | n.a. | 4.83 |
| DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% | 80% | 4.50* (0.33) |
| DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% | 50% | 4.66* (0.17) |
| DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% | 5% | 4.83 (0.00) |
| DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% | 0.1% | 4.83 (0.00) |

Légende / legend :

FR/RF : Facteur de réduction (en log) / Reducing factor (log)

* : Arrêt de l'activité du produit sur colonne lavée avec une solution de SAB à 0,5% / Suppression of product activity on column washed with 0.5% BSA

4) Evaluation de l'effet virucide du produit DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% / Evaluation of virucidal activity of DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% :

Tableau des résultats de virucidie du produit DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% en conditions de propreté sur le Virus Respiratoire Syncytial (VRS souche sauvage)

Table on virucidal activity of DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4% in clean conditions on Respiratory Syncytial Virus (RSV wild strain)

| Produit / Product | Concentration | Substance interférente / Interfering solution | Log ₁₀ DICT ₅₀ après xx min (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ after xx min (RF) | | | | >4 log réduction après xx min / >4 log reduction after xx min |
|----------------------------------|---------------|---|---|--|--|--|---|
| | | | 0 | 0.5 | 1.5 | 3 | |
| Témoin virus / Virus control | n.a. | PBS | 4.83 | n.t. | n.t. | 4.66 | n.a. |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 80% | | 1.50 ^(a) (3.33) | 1.50 ^(a) (3.33) | 1.50 ^(a) (3.33) | 1.50 ^(a) (3.33) | ≥30 sec |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 50% | | 1.50 ^(a) (3.33) | 1.50 ^(a) (3.33) | 1.50 ^(a) (3.33) | 1.50 ^(a) (3.33) | ≥30 sec |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 5% | | 0.50 (4.33) | 0.50 (4.33) | 0.50 (4.33) | 0.50 (4.33) | ≥30 sec |
| Dermanios Scrub Chlorhexidine 4% | 0.1% | | 3.33 (1.50) | n.t. | n.t. | 0.83 (4.00) | ≥30 sec |

Légende / legend :

n.a. : non applicable / non applicable

n.t. : non soumis à l'essai / non tested

FR/RF : Facteur de réduction (en log) / Reducing factor (log)

^(a) : A cause de la toxicité cellulaire de la dilution 1/10 du mélange filtré le titre en virus apparaît supérieur. Le FR peut-être sous-estimé/ Due to cellular toxicity of the dilution 1/10 of the filtered mixture, virus titer is higher. The RF may be underestimated.

Tableau des résultats de virucidie du Formaldéhyde 0,7% sur Virus Respiratoire Syncytial
(VRS souche sauvage)

Table on virucidal activity of 0.7% Formaldehyde on Respiratory Syncytial Virus (VRS wild strain)

| Produit / Product | Concentration | Substance interférente / Interfering solution | Log ₁₀ DICT ₅₀ après xx min (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ after xx min (RF) | | | | | >4 log réduction après xx min / >4 log reduction after xx min |
|------------------------------|---------------|---|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| | | | 0 | 5 | 15 | 30 | 60 | |
| Témoin virus / Virus control | n.a. | PBS | 4.66 | n.t. | n.t. | n.t. | 4.50 | n.a. |
| Formaldéhyde / Formaldehyde | 0.7% | | 4.33 (0.33) | 3.66 (1.00) | 2.00 (2.66) | 0.50 (4.16) | 0.50 (4.16) | ≥30 min |

Légende / legend :

n.a. : non applicable / non applicable

n.t. : non soumis à l'essai / non tested

FR/RF : Facteur de réduction (en log) / Reducing factor (log)

^(a) : A cause de la toxicité cellulaire de la dilution 1/10 du mélange filtré le titre en virus apparaît supérieur. Le FR peut-être sous-estimé/ Due to cellular toxicity of the dilution 1/10 of the filtered mixture, virus titer is higher. The RF may be underestimated.

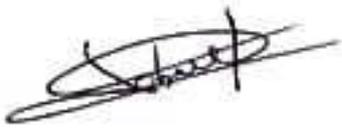
VI- Conclusion / Conclusion

Le produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** est actif à la concentration de 5% après un temps de contact de 30 secondes, dans des conditions de propreté vis-à-vis d'une souche clinique du Virus Respiratoire Syncytial (VRS).

*Product **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** is active at the concentration of 5% after 30 seconds of exposure time, in clean conditions, against a clinical strain of the Respiratory Syncytial Virus (RSV).*

Lille, le 13 février 2012

Responsable technique



Dr. P. E. LOBERT

Chef de Service

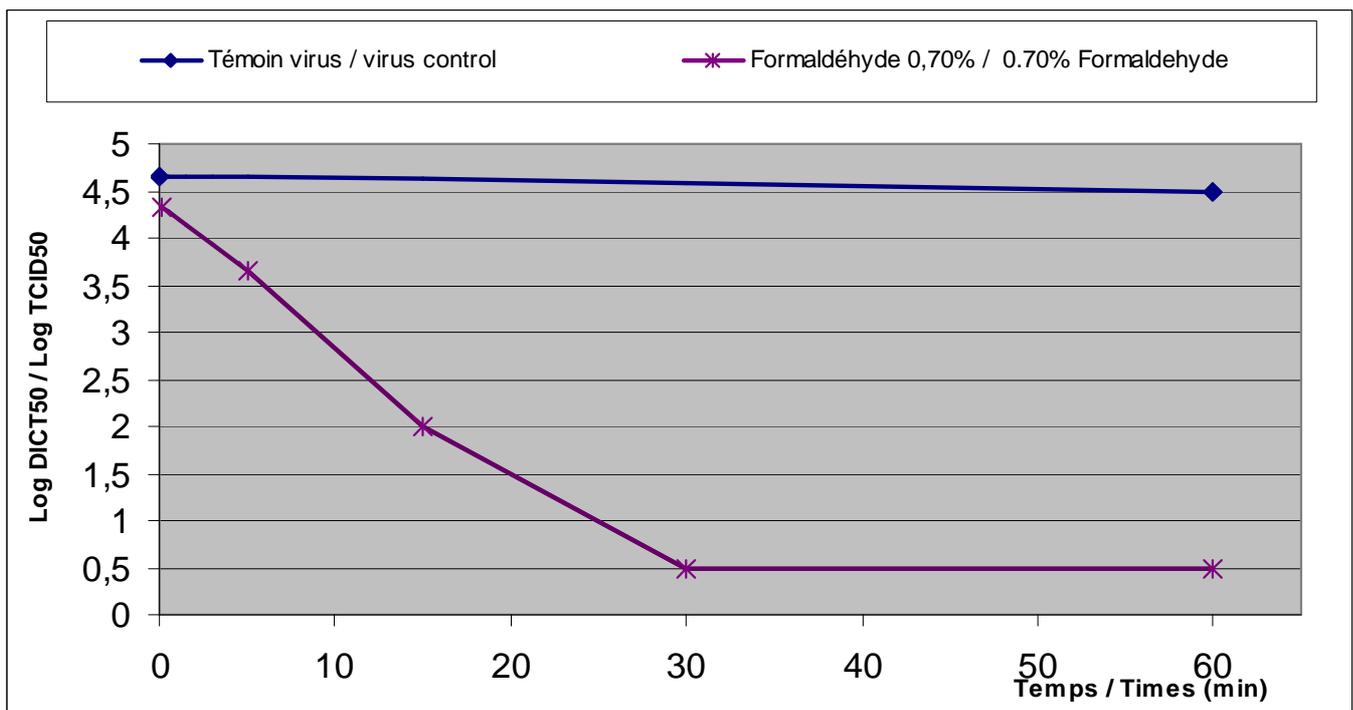
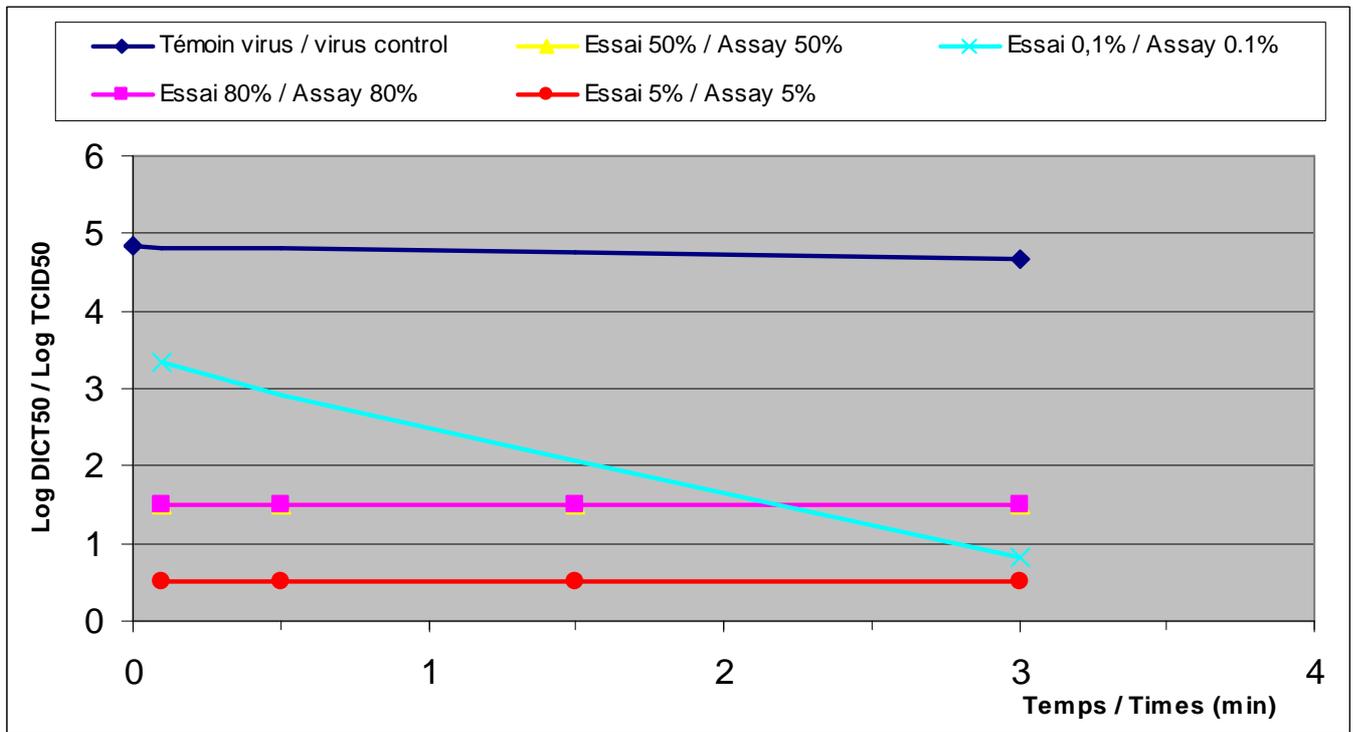


Pr. D. HOBER

Annexe 1 / Annex 1 :

Représentation graphique des résultats de virucidie du produit **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** en conditions de propreté vis-à-vis de la souche clinique du Virus Respiratoire Syncytial (VRS)

Figure of virucidal activity of **DERMANIOS SCRUB CHLORHEXIDINE 4%** in clean conditions against a clinical strain of the Respiratory Syncytial Virus (RSV)





Chemila, spol. s r.o., Za Dráhou 4386/3, Hodonín 69501, Phone +420518340919, chemila@chemila.cz
Chemical and Microbiological Laboratory, Testing Laboratory No. 1273 certified by Czech Accreditation Institute according to ČSN EN ISO/IEC 17025:2018.

Copy No.: 3

Issue No.: 4

Test report No. S362-1/2019

DETERMINATION OF SURGICAL HAND DISINFECTION (EN 12791:2016+A1:2017) OF THE PRODUCT **FORMULA 2173**

Sample ID: S362/2019

Sample name: **Formula 2173**

Client: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES, FRANCE

Producer: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES, FRANCE

Sampling point: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES, FRANCE

Page: 1

From pages: 11

Incoming date:

2.12.2019

Delivery date:

11.1.2022

Hodonín, 11.1.2022



.....
Ing. Jana Šlitrová, Head of Laboratory

The report may be reproduced only as a whole, in parts only upon written permission of the laboratory. The test results relate only to the samples stated in the Test Report. The Lab does not take any guarantee for the identity of samples not taken by the lab personnel. The test report S362-1/2019 issued on 11.1.2021 was issued again on 3.3.2021 upon the client's request for the more detailed test procedure. The test report S362-1/2019 was issued again on 30.11.2021 upon the client's request for the correction of the active substance. The test report S362-1/2019 was issued again on 11.1.2022 upon the client's request for the correction of the batch number.

Description: *Testing the efficacy of chemical disinfectants and antiseptics*

Sample ID: S362/2019

Rep No: 22

Sample name: **Formula 2173**

Sampled: by client

Sampling point: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Client: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Sampling date: 22.11.2019

Sample delivered: 2.12.2019

Testing date: 6.1. – 7.2.2020

Delivered amount: 3 x 500 ml

Batch No: B303 05S

Page: 2

Subject of testing:

Surgical hand disinfection – immediate effect and sustained effect.

Identification of the sample:

Name of the product:

Formula 2173

Batch number:

B303 05S

Date of manufacture:

10/2019

Expiry date:

09/2022

Manufacturer:

Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES,
FRANCE

Incoming date:

2.12.2019

Storage conditions:

room temperature, dark area

Active ingredients:

100 g product contains: (3,76 g) D-gluconic acid, compound with N,N"-bis(4-chlorophenyl)-3,12-diimino-2,4,11,13-tetraazatetradecanediamidine (2:1) (CHDG ; CAS number: 18472-51-0).

Experiment conditions:

Testing of disinfecting efficiency of chemical disinfecting and antiseptic agents by suspension method

SOP-M-19-00 (EN 12791:2016+A1:2017)

Effect:

immediate effect

Period of analysis:

6.1. – 17.1.2020

Test temperature:

20 °C ± 1 °C

Test method:

dilution neutralization method

Appearance of the product:

pink viscous liquid

The test concentration:

100% (concentrated)

The volume of the product:

2 x 5 ml / person, the total application volume is 10 ml

The application time:

2 x 45 s, the total application time is 1.5 min

Procedure:

handwash

Rinsing tap water:

10 s

The soap:

soft soap from linseed oil

Reference item:

CAS 71-23-8 1-Propanol p.a., batch number: K50670297843, expiry date: 31.10.2023, 60% (V/V)

The volume of the reference propan-1-ol used per person: 2 x 3 ml, according to reference surgical hand disinfection procedure, the total application volume is 6 ml

The application time:

2 x 1.5 min, according to reference surgical hand disinfection procedure, the total application time is 3 min

Neutralization medium:

Dey-Engley Neutralizing Broth M 1062

Surgical hand disinfection procedure with product: handwash procedure, immediate effect

Requirements:

The mean reduction for **immediate effect and 3-hour effect** of a product shall at least be not inferior to that achieved by a specified reference product (60% volume concentration of propan-1-ol)

To demonstrate additionally a "**sustained effect**", the mean reduction for the 3 h effect of a product shall be superior to that achieved by the reference product

Description: *Testing the efficacy of chemical disinfectants and antiseptics*

Sample ID: S362/2019

Rep No: 22

Sample name: **Formula 2173**

Sampled: by client

Sampling point: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Client: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Sampling date: 22.11.2019

Sample delivered: 2.12.2019

Testing date: 6.1. – 7.2.2020

Delivered amount: 3 x 500 ml

Batch No: B303 05S

Page: 3

Test procedure:

1. Determination of the presence of microorganisms in the product
2. Determination of the prevalue – number of cfu sampled immediately before treatment from the hand
3. Handwash procedure according to client's request: 3 ml of test product were applied to the wetted hands (tap water – 2 s) for 45 s. The standard handwash procedure was performed. Both hands were moistened again briefly with tap water (2 s) and another 3 ml of the test product were applied for further 45 s. Thereby hands were kept moist for 90 s. After the disinfection, and following EN 12791+A1 requirement, the hands were rinsed under running tap water for 10 s and then slightly dried with sterile paper towels.
4. Determination of the postvalue – number of cfu sampled after treatment from the hand
5. Expression and interpretation of results - reduction factor – ratio of prevalue and postvalue, generally expressed by decimal logarithms

The standard:

EN 12791:2016+A1:2017 Chemical disinfectants and antiseptics – Surgical hand disinfection - Test method and requirements (phase 2/step 2) November 2017

The Number of CFU in the tested product: 0 CFU/ml

Description: *Testing the efficacy of chemical disinfectants and antiseptics*

Sample ID: S362/2019

Rep No: 22

Sample name: **Formula 2173**

Sampled: by client

Sampling point: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Client: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Sampling date: 22.11.2019

Sample delivered: 2.12.2019

Testing date: 6.1. – 7.2.2020

Delivered amount: 3 x 500 ml

Batch No: B303 05S

Page: 4

1. Experimental results – **immediate effect**

Tab. No. 1.1 Surgical hand disinfection procedure – experimental results for RP – Propan-1-ol 60% V/V – 2 x 3 ml, 2 x 1.5 min

| Volunteer | | | Number of CFU per plate from dilution 10 ^x | | | | | |
|-----------|----------|----------------------|---|------------------|------------------|----------------------|------------------|------------------|
| No | Sequence | Hand (left or right) | Prevalues | | | Immediate postvalues | | |
| | | | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁰ | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² |
| 1 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>154</u> | >330 | <u>241</u> | <u>25</u> |
| 2 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>47</u> | <u>179</u> | <u>17</u> | <14 |
| 3 | RP → PP | l | >330 | <u>194</u> | <u>18</u> | <u>29</u> | <14 | <14 |
| 4 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>118</u> | >330 | <u>52</u> | <14 |
| 5 | RP → PP | l | >330 | <u>92</u> | <14 | <u>30</u> | <14 | <14 |
| 6 | RP → PP | l | <u>111</u> | <u>15</u> | <14 | <u>113</u> | <u>31</u> | <14 |
| 7 | RP → PP | r | <u>300</u> | <u>24</u> | <14 | >330 | <u>38</u> | <14 |
| 8 | RP → PP | r | >330 | >330 | <u>62</u> | >330 | >330 | <u>45</u> |
| 9 | RP → PP | r | >330 | >330 | <u>78</u> | >330 | >330 | <u>114</u> |
| 10 | RP → PP | r | >330 | <u>220</u> | <u>22</u> | >330 | >330 | <u>60</u> |
| 11 | RP → PP | r | >330 | >330 | <u>91</u> | <u>105</u> | <u>14</u> | <14 |
| 12 | RP → PP | r | >330 | >330 | <u>97</u> | >330 | >330 | <u>86</u> |
| 13 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>142</u> | >330 | <u>156</u> | <u>18</u> |
| 14 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>42</u> | >330 | <u>51</u> | <14 |
| 15 | PP → RP | l | >330 | <u>320</u> | <u>49</u> | <u>37</u> | <14 | <14 |
| 16 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>66</u> | >330 | >330 | <u>151</u> |
| 17 | PP → RP | l | >330 | <u>116</u> | <u>14</u> | <u>34</u> | <14 | <14 |
| 18 | PP → RP | l | <u>220</u> | <u>28</u> | <14 | <u>133</u> | <u>18</u> | <14 |
| 19 | PP → RP | r | >330 | >330 | <u>51</u> | >330 | >330 | <u>60</u> |
| 20 | PP → RP | r | >330 | >330 | <u>79</u> | >330 | >330 | <u>55</u> |
| 21 | PP → RP | r | >330 | >330 | <u>104</u> | >330 | >330 | <u>88</u> |
| 22 | PP → RP | r | >330 | <u>316</u> | <u>33</u> | >330 | <u>180</u> | <u>14</u> |
| 23 | PP → RP | r | >330 | >330 | <u>58</u> | <u>184</u> | <u>20</u> | <14 |
| 24 | PP → RP | r | >330 | >330 | <u>101</u> | >330 | >330 | <u>80</u> |

Tab. No. 1.2 Surgical hand disinfection procedure – experimental results for PP – **Formula 2173**– handwash, 2 x 3 ml, 2 x 45 s

| Volunteer | | | Number of CFU per plate from dilution 10 ^x | | | | | |
|-----------|----------|----------------------|---|------------------|------------------|----------------------|------------------|------------------|
| No | Sequence | Hand (left or right) | Prevalues | | | Immediate postvalues | | |
| | | | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁰ | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² |
| 1 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>93</u> | <u>300</u> | <u>31</u> | <14 |
| 2 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>55</u> | <u>202</u> | <u>17</u> | <14 |
| 3 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>66</u> | <u>101</u> | <u>19</u> | <14 |
| 4 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>108</u> | <u>100</u> | <14 | <14 |
| 5 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>69</u> | <u>119</u> | <u>24</u> | <14 |
| 6 | RP → PP | l | <u>37</u> | <14 | <14 | <14 | <14 | <14 |
| 7 | RP → PP | r | >330 | <u>281</u> | <u>26</u> | >330 | <u>40</u> | <14 |
| 8 | RP → PP | r | >330 | >330 | <u>102</u> | <u>115</u> | <14 | <14 |
| 9 | RP → PP | r | >330 | >330 | <u>143</u> | >330 | <u>330</u> | <u>61</u> |
| 10 | RP → PP | r | >330 | <u>46</u> | <14 | <14 | <14 | <14 |
| 11 | RP → PP | r | >330 | >330 | <u>93</u> | <u>190</u> | <u>29</u> | <14 |
| 12 | RP → PP | r | >330 | >330 | <u>110</u> | <u>20</u> | <14 | <14 |
| 13 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>85</u> | <14 | <14 | <14 |
| 14 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>38</u> | <u>102</u> | <u>19</u> | <14 |
| 15 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>68</u> | <u>202</u> | <u>38</u> | <14 |
| 16 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>85</u> | >330 | <u>201</u> | <u>17</u> |
| 17 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>56</u> | >330 | <u>174</u> | <u>34</u> |
| 18 | PP → RP | l | <u>170</u> | <u>18</u> | <14 | <14 | <14 | <14 |
| 19 | PP → RP | r | >330 | <u>294</u> | <u>31</u> | <u>20</u> | <14 | <14 |
| 20 | PP → RP | r | >330 | >330 | <u>78</u> | >330 | <u>284</u> | <u>56</u> |
| 21 | PP → RP | r | >330 | >330 | <u>67</u> | >330 | <u>309</u> | <u>55</u> |
| 22 | PP → RP | r | >330 | <u>69</u> | <14 | <u>120</u> | <u>14</u> | <14 |
| 23 | PP → RP | r | >330 | >330 | <u>71</u> | <u>158</u> | <u>22</u> | <14 |
| 24 | PP → RP | r | >330 | >330 | <u>104</u> | <14 | <14 | <14 |

underlined = count used for further computation, >330 = not countable

Prepared by: Mgr. Alena Rýdlová, Lab Technician

Description: Testing the efficacy of chemical disinfectants and antiseptics

Sample ID: S362/2019

Rep No: 22

Sample name: **Formula 2173**

Sampled: by client

Sampling point: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Client: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Sampling date: 22.11.2019

Sample delivered: 2.12.2019

Testing date: 6.1. – 7.2.2020

Delivered amount: 3 x 500 ml

Batch No: B303 05S

Page: 5

Tab. No. 1.3 List of computed lg values (means of left and right hands) and lg reductions

| Volunteer | Chronological Sequence | Reference handwash (RP) (Propan-1-ol 60% V/V) | | | Handwash with tested product (PP) (Formula 2173) | | |
|-----------|------------------------|--|---------------|------|---|---------------|------|
| | | lg prevalues | lg postvalues | lg R | lg prevalues | lg postvalues | lg R |
| 1 | RP → PP | 5.19 | 3.38 | 1.81 | 4.97 | 2.48 | 2.49 |
| 2 | RP → PP | 4.67 | 2.25 | 2.42 | 4.74 | 2.30 | 2.44 |
| 3 | RP → PP | 4.29 | 1.46 | 2.83 | 4.82 | 2.04 | 2.78 |
| 4 | RP → PP | 5.07 | 2.72 | 2.35 | 5.03 | 2.00 | 3.03 |
| 5 | RP → PP | 3.96 | 1.48 | 2.48 | 4.84 | 2.11 | 2.73 |
| 6 | RP → PP | 3.06 | 2.12 | 0.94 | 2.57 | 1.15 | 1.42 |
| 7 | RP → PP | 3.47 | 2.58 | 0.89 | 4.45 | 2.60 | 1.85 |
| 8 | RP → PP | 4.79 | 3.65 | 1.14 | 5.01 | 2.06 | 2.95 |
| 9 | RP → PP | 4.89 | 4.06 | 0.83 | 5.16 | 3.55 | 1.61 |
| 10 | RP → PP | 4.34 | 3.78 | 0.56 | 3.66 | 1.15 | 2.51 |
| 11 | RP → PP | 4.96 | 2.03 | 2.93 | 4.97 | 2.30 | 2.67 |
| 12 | RP → PP | 4.99 | 3.93 | 1.06 | 5.04 | 1.30 | 3.74 |
| 13 | PP → RP | 5.15 | 3.20 | 1.95 | 4.93 | 1.15 | 3.78 |
| 14 | PP → RP | 4.62 | 2.71 | 1.91 | 4.58 | 2.04 | 2.54 |
| 15 | PP → RP | 4.53 | 1.57 | 2.96 | 4.83 | 2.34 | 2.49 |
| 16 | PP → RP | 4.82 | 4.18 | 0.64 | 4.93 | 3.30 | 1.63 |
| 17 | PP → RP | 4.07 | 1.53 | 2.54 | 4.75 | 3.28 | 1.47 |
| 18 | PP → RP | 3.35 | 2.14 | 1.21 | 3.23 | 1.15 | 2.08 |
| 19 | PP → RP | 4.71 | 3.78 | 0.93 | 4.47 | 1.30 | 3.17 |
| 20 | PP → RP | 4.90 | 3.74 | 1.16 | 4.89 | 3.49 | 1.40 |
| 21 | PP → RP | 5.02 | 3.94 | 1.08 | 4.83 | 3.51 | 1.31 |
| 22 | PP → RP | 4.50 | 3.25 | 1.25 | 3.84 | 2.09 | 1.75 |
| 23 | PP → RP | 4.76 | 2.27 | 2.49 | 4.85 | 2.21 | 2.64 |
| 24 | PP → RP | 5.00 | 3.90 | 1.10 | 5.02 | 1.15 | 3.87 |
| Ø | Overall | 4.55 | 2.90 | 1.64 | 4.60 | 2.17 | 2.43 |
| s | | 0.58 | 0.93 | 0.79 | 0.64 | 0.81 | 0.77 |
| n | | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 |
| Ø | RP → PP | 4.47 | 2.79 | 1.69 | 4.60 | 2.09 | 2.52 |
| s | | 0.67 | 0.95 | 0.87 | 0.76 | 0.68 | 0.64 |
| n | | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| Ø | PP → RP | 4.62 | 3.02 | 1.60 | 4.60 | 2.25 | 2.35 |
| s | | 0.49 | 0.95 | 0.74 | 0.53 | 0.95 | 0.90 |
| n | | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |

lg R = decimal log reduction; RP → PP sequence: first RP, second PP; PP → RP sequence: first PP, second RP;

Ø = mean; s = standard deviation; n = number of values (= volunteers)

Difference of mean Rs (RP → PP): $1.69 - 2.52 = -0.83$; Difference of mean Rs (PP → RP): $1.60 - 2.35 = -0.75$;

Absolute difference of differences: $|-0.83 - (-0.75)| = 0.08$

Acceptance criteria for test results:

Only if the results of the test procedure fulfil the following requirements, they shall be accepted for further evaluation, otherwise the test shall be repeated:

- A complete set of results from at least 23, but maximum 28 volunteers shall be available. All complete sets of results shall be used for further evaluation.
- The overall means of the lg prevalues for RP and PP shall be both at least 3.50.
- The absolute difference of mean differences between lg reductions of RP and PP of group RP → PP and group PP → RP shall be less than 2.00.
- All quotients of weighted mean counts between 5 and 15.

Description: *Testing the efficacy of chemical disinfectants and antiseptics*

Sample ID: S362/2019

Rep No: 22

Sample name: **Formula 2173**

Sampled: by client

Sampling point: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Client: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Sampling date: 22.11.2019

Sample delivered: 2.12.2019

Testing date: 6.1. – 7.2.2020

Delivered amount: 3 x 500 ml

Batch No: B303 05S

Page: 6

Tab. No. 1.4.1 Computation of individual differences of lg Rs of RP – PP

| Volunteer | lg reduction (R) | | Difference RP – PP |
|-----------|--------------------------|------------------------|--------------------|
| | Reference procedure (RP) | Product procedure (PP) | |
| 1 | 1.81 | 2.49 | -0.68 |
| 2 | 2.42 | 2.44 | -0.02 |
| 3 | 2.83 | 2.78 | 0.05 |
| 4 | 2.35 | 3.03 | -0.68 |
| 5 | 2.48 | 2.73 | -0.25 |
| 6 | 0.94 | 1.42 | -0.48 |
| 7 | 0.89 | 1.85 | -0.96 |
| 8 | 1.14 | 2.95 | -1.81 |
| 9 | 0.83 | 1.61 | -0.78 |
| 10 | 0.56 | 2.51 | -1.95 |
| 11 | 2.93 | 2.67 | 0.26 |
| 12 | 1.06 | 3.74 | -2.68 |
| 13 | 1.95 | 3.78 | -1.83 |
| 14 | 1.91 | 2.54 | -0.63 |
| 15 | 2.96 | 2.49 | 0.47 |
| 16 | 0.64 | 1.63 | -0.99 |
| 17 | 2.54 | 1.47 | 1.07 |
| 18 | 1.21 | 2.08 | -0.87 |
| 19 | 0.93 | 3.17 | -2.24 |
| 20 | 1.16 | 1.40 | -0.24 |
| 21 | 1.08 | 1.31 | -0.23 |
| 22 | 1.25 | 1.75 | -0.50 |
| 23 | 2.49 | 2.64 | -0.15 |
| 24 | 1.10 | 3.87 | -2.77 |

Tab. No. 1.4.2 Computation for Hodges-Lehmann 97.5% upper confidence limits

| | Sorted differences | Mean pairwise differences (d _i +d _{ii})/2 | | | | | | | | | | | | |
|----|--------------------|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1.07 | 0.47 | 0.05 | -0.02 | -0.15 | -0.23 | -0.24 | -0.24 | -0.25 | -0.48 | -0.50 | -0.63 | |
| 1 | 1.07 | 1.07 ¹ | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 0.47 | 0.77 ² | 0.47 ⁵ | | | | | | | | | | | |
| 3 | 0.05 | 0.56 ³ | 0.26 ¹³ | 0.05 ²⁶ | | | | | | | | | | |
| 4 | -0.02 | 0.53 ⁴ | 0.23 ¹⁴ | 0.02 ²⁸ | -0.02 ³¹ | | | | | | | | | |
| 5 | -0.15 | 0.46 ⁶ | 0.16 ¹⁸ | -0.05 ³² | -0.09 ³⁵ | -0.15 ⁴⁵ | | | | | | | | |
| 6 | -0.23 | 0.42 ⁷ | 0.12 ²⁰ | -0.09 ³⁴ | -0.13 ⁴¹ | -0.19 ⁴⁷ | -0.23 ⁵⁴ | | | | | | | |
| 7 | -0.24 | 0.42 ⁸ | 0.12 ²¹ | -0.10 ³⁶ | -0.13 ⁴² | -0.20 ⁴⁹ | -0.24 ⁵⁵ | -0.24 ⁵⁸ | | | | | | |
| 8 | -0.24 | 0.42 ⁹ | 0.12 ²² | -0.10 ³⁷ | -0.13 ⁴³ | -0.20 ⁵⁰ | -0.24 ⁵⁶ | -0.24 ⁵⁹ | -0.24 ⁶⁰ | | | | | |
| 9 | -0.25 | 0.41 ¹⁰ | 0.11 ²³ | -0.10 ³⁸ | -0.14 ⁴⁴ | -0.20 ⁵¹ | -0.24 ⁵⁷ | -0.25 ⁶³ | -0.25 ⁶⁴ | -0.25 ⁶⁵ | | | | |
| 10 | -0.48 | 0.30 ¹¹ | -0.01 ²⁹ | -0.22 ⁵² | -0.25 ⁶² | -0.32 ⁷¹ | -0.36 ⁷⁶ | -0.36 ⁷⁷ | -0.36 ⁷⁸ | -0.37 | -0.48 | | | |
| 11 | -0.50 | 0.29 ¹² | -0.02 ³⁰ | -0.23 ⁵³ | -0.26 ⁶⁷ | -0.33 ⁷³ | -0.37 ⁸¹ | -0.37 ⁸² | -0.37 | -0.38 | -0.49 | -0.50 | | |
| 12 | -0.63 | 0.22 ¹⁵ | -0.08 ³³ | -0.29 ⁶⁸ | -0.33 ⁷² | -0.39 | -0.43 | -0.44 | -0.44 | -0.44 | -0.44 | -0.56 | -0.57 | -0.63 |
| 13 | -0.68 | 0.20 ¹⁶ | -0.11 ³⁹ | -0.32 ⁶⁹ | -0.35 ⁷⁴ | -0.42 | -0.46 | -0.46 | -0.46 | -0.46 | -0.47 | -0.58 | -0.59 | -0.66 |
| 14 | -0.68 | 0.20 ¹⁷ | -0.11 ⁴⁰ | -0.32 ⁷⁰ | -0.35 ⁷⁵ | -0.42 | -0.46 | -0.46 | -0.46 | -0.46 | -0.47 | -0.58 | -0.59 | |
| 15 | -0.78 | 0.15 ¹⁹ | -0.16 ⁴⁶ | -0.37 ⁸⁰ | -0.40 | -0.47 | -0.51 | -0.51 | -0.51 | -0.51 | -0.52 | -0.63 | | |
| 16 | -0.87 | 0.10 ²⁴ | -0.20 ⁴⁸ | -0.41 | -0.45 | -0.51 | -0.55 | -0.56 | -0.56 | -0.56 | -0.56 | | | |
| 17 | -0.96 | 0.06 ²⁵ | -0.25 ⁶¹ | -0.46 | -0.49 | -0.56 | -0.60 | -0.60 | -0.60 | | | | | |
| 18 | -0.99 | 0.04 ²⁷ | -0.26 ⁶⁶ | -0.47 | -0.51 | -0.57 | -0.61 | -0.62 | | | | | | |
| 19 | -1.81 | -0.37 ⁷⁹ | -0.67 | -0.88 | -0.92 | -0.98 | -1.02 | | | | | | | |
| 20 | -1.83 | -0.38 | -0.68 | -0.89 | -0.93 | -0.99 | | | | | | | | |
| 21 | -1.95 | -0.44 | -0.74 | -0.95 | -0.99 | | | | | | | | | |
| 22 | -2.24 | -0.59 | -0.89 | -1.10 | | | | | | | | | | |
| 23 | -2.68 | -0.81 | -1.11 | | | | | | | | | | | |
| 24 | -2.77 | -0.85 | | | | | | | | | | | | |

The median is between the 12th and 13th value: $[-0.63 + -0.68]/2 = -0.655$

The mean pairwise differences that do not exceed the median (here: 0.655) are computed. From table in EN 12791:2016+A1:2017 of critical values for Wilcoxon's matched-pairs signed-ranks test the entry for n=24 and a one-sided 0.025 level of significance, the critical value of 81 is found. Hence $c=81+1=82$. The pairwise differences are sorted in descending order (small exponents). The 82nd value is -0.37. Hence the Hodges-Lehmann upper one-sided 97.5% confidence limit for the difference in lg Rs between RP and PP is -0.37, which is less than the agreed inferiority margin of 0.75. Therefore the hypothesis of inferiority of PP is rejected and it can be concluded the test preparation PP is non-inferior to RP.

Description: *Testing the efficacy of chemical disinfectants and antiseptics*

Sample ID: S362/2019

Rep No: 22

Sample name: **Formula 2173**

Sampled: by client

Sampling point: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Client: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Sampling date: 22.11.2019

Sample delivered: 2.12.2019

Testing date: 6.1. – 7.2.2020

Delivered amount: 3 x 500 ml

Batch No: B303 05S

Page: 7

Experiment conditions:

Testing of disinfecting efficiency of chemical disinfecting and antiseptic agents by suspension method

SOP-M-19-00 (EN 12791+A1)

Effect:

3 h effect

Period of analysis:

27.1. – 7.2.2020

Test temperature:

20 °C ± 1 °C

Test method:

dilution neutralization method

Appearance of the product:

pink viscous liquid

The test concentration:

100% (concentrated)

The volume of the product:

2 x 3 ml / person, the total application volume is 6 ml

The application time:

2 x 2.5 min, the total application time is 5 min

The soap:

soft soap from linseed oil

Procedure:

handwash

Rinsing tap water:

10 s

Reference item:

CAS 71-23-8 1-Propanol p.a., batch number: K50670297843, expiry date: 31.10.2023, 60% (V/V)

The volume of the reference propan-1-ol used per person: 2 x 3 ml, according to reference surgical hand disinfection procedure, the total application volume is 6 ml

The application time:

2 x 1.5 min, according to reference surgical hand disinfection procedure, the total application time is 3 min

Neutralization medium:

Dey-Engley Neutralizing Broth M 1062

Surgical hand disinfection procedure with product: handwash procedure, 3 h effect

Requirements:

The mean reduction for **immediate effect and 3-hour effect** of a product shall at least be not inferior to that achieved by a specified reference product (60% volume concentration of propan-1-ol)
To demonstrate additionally a "**sustained effect**", the mean reduction for the 3 h effect of a product shall be superior to that achieved by the reference product

Test procedure:

1. Determination of the presence of microorganisms in the product
2. Determination of the prevalue – number of cfu sampled immediately before treatment from the hand
3. Handwash procedure according to client's request: 3 ml of test product were applied to the wetted hands (tap water – 2 s) for 2.5 min. The standard handwash procedure was performed. Both hands were moistened again briefly with tap water (2 s) and another 3 ml of the test product were applied for 2.5 min. Thereby hands were kept moist for 5 min. After the disinfection, and following EN 12791+A1 requirement, the hands were rinsed under running tap water for 10 s and then slightly dried with sterile paper towels.
4. Determination of the postvalue – number of cfu sampled after treatment from the hand after wearing surgical gloves for 3 h following disinfection
5. Expression and interpretation of results - reduction factor – ratio of prevalue and postvalue, generally expressed by decimal logarithms

The standard:

EN 12791:2016+A1:2017 Chemical disinfectants and antiseptics – Surgical hand disinfection - Test method and requirements (phase 2/step 2) November 2017

Description: *Testing the efficacy of chemical disinfectants and antiseptics*

Sample ID: S362/2019

Rep No: 22

Sample name: **Formula 2173**

Sampled: by client

Sampling point: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Client: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Sampling date: 22.11.2019

Sample delivered: 2.12.2019

Testing date: 6.1. – 7.2.2020

Delivered amount: 3 x 500 ml

Batch No: B303 05S

Page: 8

2. Experimental results – 3 h effect

Tab. No. 2.1 Surgical hand disinfection procedure – experimental results for RP – Propan-1-ol 60% V/V – 2 x 3 ml, 2 x 1.5 min, gloves for 3 h

| Volunteer | | | Number of CFU per plate from dilution 10 ⁿ | | | | | |
|-----------|----------|----------------------|---|------------------|------------------|----------------------|------------------|------------------|
| No | Sequence | Hand (left or right) | Prevalues | | | Immediate postvalues | | |
| | | | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁰ | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² |
| 1 | RP → PP | r | >330 | >330 | <u>57</u> | >330 | <u>208</u> | <u>22</u> |
| 2 | RP → PP | r | >330 | >330 | <u>120</u> | >330 | >330 | <u>324</u> |
| 3 | RP → PP | r | <u>128</u> | <u>14</u> | <14 | >330 | <u>45</u> | <14 |
| 4 | RP → PP | r | >330 | <u>292</u> | <u>31</u> | <u>136</u> | <u>15</u> | <14 |
| 5 | RP → PP | r | >330 | >330 | <u>122</u> | >330 | <u>50</u> | <14 |
| 6 | RP → PP | r | <u>118</u> | <14 | <14 | >330 | <u>116</u> | <14 |
| 7 | RP → PP | l | >330 | <u>140</u> | <u>19</u> | >330 | >330 | <u>146</u> |
| 8 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>120</u> | >330 | <u>95</u> | <14 |
| 9 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>113</u> | >330 | <u>63</u> | <14 |
| 10 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>81</u> | <u>58</u> | <14 | <14 |
| 11 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>119</u> | <u>45</u> | <14 | <14 |
| 12 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>70</u> | >330 | <u>272</u> | <u>26</u> |
| 13 | PP → RP | r | >330 | >330 | <u>39</u> | >330 | <u>41</u> | <14 |
| 14 | PP → RP | r | >330 | >330 | <u>96</u> | >330 | >330 | <u>248</u> |
| 15 | PP → RP | r | <u>134</u> | <u>17</u> | <14 | <u>104</u> | <u>20</u> | <14 |
| 16 | PP → RP | r | >330 | <u>262</u> | <u>26</u> | >330 | <u>60</u> | <14 |
| 17 | PP → RP | r | >330 | >330 | <u>135</u> | >330 | <u>53</u> | <14 |
| 18 | PP → RP | r | >330 | <u>204</u> | <u>14</u> | >330 | <u>165</u> | <u>19</u> |
| 19 | PP → RP | l | >330 | <u>184</u> | <u>20</u> | >330 | >330 | <u>87</u> |
| 20 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>125</u> | >330 | >330 | <u>92</u> |
| 21 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>117</u> | >330 | >330 | <u>34</u> |
| 22 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>69</u> | >330 | <u>106</u> | <14 |
| 23 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>71</u> | <u>220</u> | <u>25</u> | <14 |
| 24 | PP → RP | l | >330 | <u>100</u> | <u>14</u> | >330 | <u>220</u> | <u>17</u> |

Tab. No. 2.2 Surgical hand disinfection procedure – experimental results for PP – Formula 2173– handwash, 2 x 3 ml, 2 x 2.5 min, gloves for 3 h

| Volunteer | | | Number of CFU per plate from dilution 10 ⁿ | | | | | |
|-----------|----------|----------------------|---|------------------|------------------|----------------------|------------------|------------------|
| No | Sequence | Hand (left or right) | Prevalues | | | Immediate postvalues | | |
| | | | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁰ | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² |
| 1 | RP → PP | r | >330 | <u>188</u> | <u>15</u> | <14 | <14 | <14 |
| 2 | RP → PP | r | >330 | >330 | <u>119</u> | >330 | <u>71</u> | <14 |
| 3 | RP → PP | r | <u>88</u> | <14 | <14 | <14 | <14 | <14 |
| 4 | RP → PP | r | >330 | <u>248</u> | <u>26</u> | <u>92</u> | <14 | <14 |
| 5 | RP → PP | r | >330 | >330 | <u>90</u> | >330 | <u>248</u> | <u>42</u> |
| 6 | RP → PP | r | >330 | >330 | <u>69</u> | >330 | >330 | <u>36</u> |
| 7 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>66</u> | >330 | <u>75</u> | <14 |
| 8 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>97</u> | >330 | >330 | <u>49</u> |
| 9 | RP → PP | l | >330 | <u>128</u> | <u>15</u> | >330 | >330 | <u>113</u> |
| 10 | RP → PP | l | >330 | >330 | <u>96</u> | >330 | <u>105</u> | <14 |
| 11 | RP → PP | l | >330 | <u>38</u> | <14 | <14 | <14 | <14 |
| 12 | RP → PP | l | >330 | <u>184</u> | <u>16</u> | >330 | >330 | <u>180</u> |
| 13 | PP → RP | r | >330 | <u>55</u> | <14 | <14 | <14 | <14 |
| 14 | PP → RP | r | >330 | >330 | <u>71</u> | >330 | <u>99</u> | <14 |
| 15 | PP → RP | r | >330 | <u>53</u> | <14 | <u>141</u> | <u>14</u> | <14 |
| 16 | PP → RP | r | >330 | <u>244</u> | <u>28</u> | <u>174</u> | <u>25</u> | <14 |
| 17 | PP → RP | r | >330 | >330 | <u>69</u> | >330 | <u>84</u> | <14 |
| 18 | PP → RP | r | >330 | >330 | <u>88</u> | >330 | <u>204</u> | <u>38</u> |
| 19 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>51</u> | >330 | <u>244</u> | <u>22</u> |
| 20 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>104</u> | >330 | >330 | <u>240</u> |
| 21 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>39</u> | >330 | >330 | <u>224</u> |
| 22 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>71</u> | >330 | <u>93</u> | <14 |
| 23 | PP → RP | l | >330 | <u>55</u> | <14 | <14 | <14 | <14 |
| 24 | PP → RP | l | >330 | >330 | <u>48</u> | >330 | >330 | <u>232</u> |

underlined = count used for further computation, >330 = not countable

Prepared by: Mgr. Alena Rýdlová, Lab Technician

Description: *Testing the efficacy of chemical disinfectants and antiseptics*

Sample ID: S362/2019

Rep No: 22

Sample name: **Formula 2173**

Sampled: by client

Sampling point: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Client: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Sampling date: 22.11.2019

Sample delivered: 2.12.2019

Testing date: 6.1. – 7.2.2020

Delivered amount: 3 x 500 ml

Batch No: B303 05S

Page: 9

Tab. No. 2.3 List of computed lg values (means of left and right hands) and lg reductions

| Volunteer | Chronological Sequence | Reference handwash (RP) (Propan-2-ol 60% V/V) | | | Handwash with tested product (PP) (Formula 2173) | | |
|-----------|------------------------|--|---------------|------|---|---------------|------|
| | | lg prevalues | lg postvalues | lg R | lg prevalues | lg postvalues | lg R |
| 1 | RP → PP | 4.76 | 3.32 | 1.44 | 4.27 | 1.15 | 3.12 |
| 2 | RP → PP | 5.08 | 4.51 | 0.57 | 5.08 | 2.85 | 2.23 |
| 3 | RP → PP | 3.11 | 2.65 | 0.46 | 2.94 | 1.15 | 1.79 |
| 4 | RP → PP | 4.47 | 2.14 | 2.33 | 4.40 | 1.96 | 2.44 |
| 5 | RP → PP | 5.09 | 2.70 | 2.39 | 4.95 | 3.42 | 1.53 |
| 6 | RP → PP | 3.07 | 3.06 | 0.01 | 4.84 | 3.56 | 1.28 |
| 7 | RP → PP | 4.16 | 4.16 | 0.00 | 4.82 | 2.88 | 1.94 |
| 8 | RP → PP | 5.08 | 2.98 | 2.10 | 4.99 | 3.69 | 1.30 |
| 9 | RP → PP | 5.05 | 2.80 | 2.25 | 4.11 | 4.05 | 0.06 |
| 10 | RP → PP | 4.91 | 1.76 | 3.15 | 4.98 | 3.02 | 1.96 |
| 11 | RP → PP | 5.08 | 1.65 | 3.43 | 3.58 | 1.15 | 2.43 |
| 12 | RP → PP | 4.85 | 3.43 | 1.42 | 4.26 | 4.26 | 0.00 |
| 13 | RP → PP | 4.59 | 2.61 | 1.98 | 3.74 | 1.15 | 2.59 |
| 14 | PP → RP | 4.98 | 4.39 | 0.59 | 4.85 | 3.00 | 1.85 |
| 15 | PP → RP | 3.14 | 2.05 | 1.09 | 3.72 | 2.15 | 1.57 |
| 16 | PP → RP | 4.42 | 2.78 | 1.64 | 4.39 | 2.26 | 2.13 |
| 17 | PP → RP | 5.13 | 2.72 | 2.41 | 4.84 | 2.92 | 1.92 |
| 18 | PP → RP | 4.30 | 3.22 | 1.08 | 4.94 | 3.34 | 1.60 |
| 19 | PP → RP | 4.27 | 3.94 | 0.33 | 4.71 | 3.38 | 1.33 |
| 20 | PP → RP | 5.10 | 3.96 | 1.14 | 5.02 | 4.38 | 0.64 |
| 21 | PP → RP | 5.07 | 3.53 | 1.54 | 4.59 | 4.35 | 0.24 |
| 22 | PP → RP | 4.84 | 3.03 | 1.81 | 4.85 | 2.97 | 1.88 |
| 23 | PP → RP | 4.85 | 2.35 | 2.50 | 3.74 | 1.15 | 2.59 |
| 24 | PP → RP | 4.02 | 3.33 | 0.69 | 4.68 | 4.37 | 0.31 |
| Ø | Overall | 4.56 | 3.05 | 1.51 | 4.47 | 2.86 | 1.62 |
| s | | 0.65 | 0.78 | 0.95 | 0.57 | 1.11 | 0.85 |
| n | | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 |
| Ø | RP → PP | 4.56 | 2.93 | 1.63 | 4.43 | 2.76 | 1.67 |
| s | | 0.74 | 0.86 | 1.17 | 0.65 | 1.14 | 0.93 |
| n | | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| Ø | PP → RP | 4.56 | 3.16 | 1.40 | 4.51 | 2.95 | 1.56 |
| s | | 0.58 | 0.71 | 0.70 | 0.49 | 1.13 | 0.80 |
| n | | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |

lg R = decimal log reduction; RP → PP sequence: first RP, second PP; PP → RP sequence: first PP, second RP;

Ø = mean; s = standard deviation; n = number of values (= volunteers)

Difference of mean Rs (RP → PP): 1.63 - 1.67 = -0.04; Difference of mean Rs (PP → RP): 1.40 - 1.56 = -0.16;

Absolute difference of differences: |-0.04 - (-0.16)| = 0.12

Acceptance criteria for test results:

Only if the results of the test procedure fulfil the following requirements, they shall be accepted for further evaluation, otherwise the test shall be repeated:

- A complete set of results from at least 23, but maximum 28 volunteers shall be available. All complete sets of results shall be used for further evaluation.
- The overall means of the lg prevalues for RP and PP shall be both at least 3.50.
- Not more than three individual lg reductions less than 3.00 shall occur in RP.
- The absolute difference of mean differences between lg reductions of RP and PP of group RP → PP and group PP → RP shall be less than 2.00.
- All quotients of weighted mean counts between 5 and 15.

Description: Testing the efficacy of chemical disinfectants and antiseptics

Sample ID: S362/2019

Rep No: 22

Sample name: **Formula 2173**

Sampled: by client

Sampling point: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Client: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Sampling date: 22.11.2019

Sample delivered: 2.12.2019

Testing date: 6.1. – 7.2.2020

Delivered amount: 3 x 500 ml

Batch No: B303 05S

Page: 10

Tab. No. 2.4.1 Computation of individual differences of lg Rs of RP – PP

| Volunteer | lg reduction (R) | | Difference RP – PP |
|-----------|--------------------------|------------------------|--------------------|
| | Reference procedure (RP) | Product procedure (PP) | |
| 1 | 1.44 | 3.12 | -1.68 |
| 2 | 0.57 | 2.23 | -1.66 |
| 3 | 0.46 | 1.79 | -1.33 |
| 4 | 2.33 | 2.44 | -0.11 |
| 5 | 2.39 | 1.53 | 0.86 |
| 6 | 0.01 | 1.28 | -1.27 |
| 7 | 0.00 | 1.94 | -1.94 |
| 8 | 2.10 | 1.30 | 0.80 |
| 9 | 2.25 | 0.06 | 2.19 |
| 10 | 3.15 | 1.96 | 1.19 |
| 11 | 3.43 | 2.43 | 1.00 |
| 12 | 1.42 | 0.00 | 1.42 |
| 13 | 1.98 | 2.59 | -0.61 |
| 14 | 0.59 | 1.85 | -1.26 |
| 15 | 1.09 | 1.57 | -0.48 |
| 16 | 1.64 | 2.13 | -0.49 |
| 17 | 2.41 | 1.92 | 0.49 |
| 18 | 1.08 | 1.60 | -0.52 |
| 19 | 0.33 | 1.33 | -1.00 |
| 20 | 1.14 | 0.64 | 0.50 |
| 21 | 1.54 | 0.24 | 1.30 |
| 22 | 1.81 | 1.88 | -0.07 |
| 23 | 2.50 | 2.59 | -0.09 |
| 24 | 0.69 | 0.31 | 0.38 |

Tab. No. 2.4.2 Computation for Hodges-Lehmann 97.5% upper confidence limits

| | Sorted differences | Mean pairwise differences (d _i +d _{ii})/2 | | | | | | | | | | | | |
|----|--------------------|--|--------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|-------|-------|--|
| | | 2.19 | 1.42 | 1.30 | 1.19 | 1.00 | 0.86 | 0.80 | 0.50 | 0.49 | 0.38 | -0.07 | -0.09 | |
| 1 | 2.19 | 2.19 ¹ | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 1.42 | 1.81 ² | 1.42 ⁸ | | | | | | | | | | | |
| 3 | 1.30 | 1.75 ³ | 1.36 ⁹ | 1.30 ¹³ | | | | | | | | | | |
| 4 | 1.19 | 1.69 ⁴ | 1.31 ¹² | 1.25 ¹⁵ | 1.19 ¹⁷ | | | | | | | | | |
| 5 | 1.00 | 1.60 ⁵ | 1.21 ¹⁶ | 1.15 ¹⁸ | 1.10 ²¹ | 1.00 ²⁹ | | | | | | | | |
| 6 | 0.86 | 1.53 ⁶ | 1.14 ¹⁹ | 1.08 ²² | 1.03 ²⁷ | 0.93 ³² | 0.86 ³⁸ | | | | | | | |
| 7 | 0.80 | 1.50 ⁷ | 1.11 ²⁰ | 1.05 ²⁵ | 1.00 ²⁸ | 0.90 ³⁶ | 0.83 ⁴⁴ | 0.80 ⁴⁵ | | | | | | |
| 8 | 0.50 | 1.35 ¹⁰ | 0.96 ³⁰ | 0.90 ³⁴ | 0.85 ⁴⁰ | 0.75 ⁴⁸ | 0.68 ⁵² | 0.65 ⁵⁶ | 0.50 ⁶⁷ | | | | | |
| 9 | 0.49 | 1.34 ¹¹ | 0.96 ³¹ | 0.90 ³⁵ | 0.84 ⁴³ | 0.75 ⁴⁹ | 0.68 ⁵³ | 0.65 ⁵⁷ | 0.50 ⁶⁸ | 0.49 ⁶⁹ | | | | |
| 10 | 0.38 | 1.29 ¹⁴ | 0.90 ³³ | 0.84 ⁴² | 0.79 ⁴⁷ | 0.69 ⁵⁰ | 0.62 ⁵⁹ | 0.59 ⁶³ | 0.44 ⁷⁸ | 0.44 ⁷⁹ | 0.38 | | | |
| 11 | -0.07 | 1.06 ²³ | 0.68 ⁵¹ | 0.62 ⁵⁸ | 0.56 ⁶⁴ | 0.47 ⁷³ | 0.40 | 0.37 | 0.22 | 0.21 | 0.16 | -0.07 | | |
| 12 | -0.09 | 1.05 ²⁴ | 0.67 ⁵⁴ | 0.61 ⁶⁰ | 0.55 ⁶⁵ | 0.46 ⁷⁴ | 0.39 | 0.36 | 0.21 | 0.20 | 0.15 | -0.08 | -0.09 | |
| 13 | -0.11 | 1.04 ²⁶ | 0.66 ⁵⁵ | 0.60 ⁶² | 0.54 ⁶⁶ | 0.45 ⁷⁷ | 0.38 | 0.35 | 0.20 | 0.19 | 0.14 | -0.09 | -0.10 | |
| 14 | -0.48 | 0.86 ³⁷ | 0.47 ⁷¹ | 0.41⁸² | 0.36 | 0.26 | 0.19 | 0.16 | 0.01 | 0.01 | -0.05 | -0.28 | | |
| 15 | -0.49 | 0.85 ³⁹ | 0.47 ⁷² | 0.41 | 0.35 | 0.26 | 0.19 | 0.16 | 0.01 | 0.00 | -0.06 | | | |
| 16 | -0.52 | 0.84 ⁴¹ | 0.45 ⁷⁶ | 0.39 | 0.34 | 0.24 | 0.17 | 0.14 | -0.01 | -0.02 | | | | |
| 17 | -0.61 | 0.79 ⁴⁶ | 0.41 ⁸¹ | 0.35 | 0.29 | 0.20 | 0.13 | 0.10 | -0.06 | | | | | |
| 18 | -1.00 | 0.60 ⁶¹ | 0.21 | 0.15 | 0.10 | 0.00 | -0.07 | -0.10 | | | | | | |
| 19 | -1.26 | 0.47 ⁷⁰ | 0.08 | 0.02 | -0.04 | -0.13 | -0.20 | | | | | | | |
| 20 | -1.27 | 0.46 ⁷⁵ | 0.08 | 0.02 | -0.04 | -0.14 | | | | | | | | |
| 21 | -1.33 | 0.43 ⁸⁰ | 0.04 | -0.02 | -0.07 | | | | | | | | | |
| 22 | -1.66 | 0.27 | -0.12 | -0.18 | | | | | | | | | | |
| 23 | -1.68 | 0.26 | -0.13 | | | | | | | | | | | |
| 24 | -1.94 | 0.13 | | | | | | | | | | | | |

The median is between the 12th and 13th value: $[-0.09 + -0.11]/2 = -0.10$. The mean pairwise differences that do not exceed the median (here: -0.10) are computed. For 3 hour's effect - From table in EN 12791:2016+A1:2017 of critical values for Wilcoxon's matched-pairs signed-ranks test the entry for n =24 and a one-sided 0.025 level of significance, the critical value of 81 is found. Hence $c=81+1=82$. The pairwise differences are sorted in descending order (small exponents). The 82th value is 0.41. Hence the Hodges-Lehmann upper one-sided 97.5% confidence limit for the difference in lg Rs between RP and PP is 0.41, which is less than the agreed inferiority margin of 0.85. Therefore the hypothesis of inferiority of PP is rejected and it can be concluded the test preparation PP is non-inferior to RP.

Description: *Testing the efficacy of chemical disinfectants and antiseptics*

Sample ID: S362/2019

Rep No: 22

Sample name: **Formula 2173**

Sampled: by client

Sampling point: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Client: Laboratoires ANIOS, 1 Rue de L'espoir, 59260 LEZENNES

Sampling date: 22.11.2019

Sample delivered: 2.12.2019

Testing date: 6.1. – 7.2.2020

Delivered amount: 3 x 500 ml

Batch No: B303 05S

Page: 11

Interpretation:

Results of tests are in Tabs.

Surgical hand disinfection – immediate effect

The acceptance criteria for the test results were met.

The product **Formula 2173**, batch No: B303 05S, was tested according to EN 12791:2016+A1:2017 for **immediate effect** under test conditions: application volume 2 x 5 ml/person and application time 2 x 45 s. The Hodges-Lehmann upper one-sided 97.5% confidence limit for the difference in lg Rs between RP and PP is smaller (**-0.37**) than the agreed inferiority margin of 0.75. Therefore the hypothesis of inferiority of **Formula 2173** is rejected and it can be concluded that the test preparation **Formula 2173** is non-inferior to **propan-1-ol 60%**.

Surgical hand disinfection – 3 h effect

The acceptance criteria for the test results were met.

The product **Formula 2173**, batch No: B303 05S, was tested according to EN 12791:2016+A1:2017 for **3 hours effect** under test conditions: application volume 2 x 3 ml/person and application time 2 x 2.5 min.

For 3 hour's effect - From table in EN EN 12791:2016+A1:2017 of critical values for Wilcoxon's matched-pairs signed-ranks test the entry for n = 24 and a one-sided 0.025 level of significance, the critical value of 81 is found.

Hence c = 81 + 1 = 82. The pairwise differences are sorted in descending order (small exponents). **The 82th value is 0.41.** Hence the Hodges-Lehmann upper one-sided 97.5% confidence limit for the difference in lg Rs between RP and PP is **0.41**, which is less than the agreed inferiority margin of 0.85.

Therefore the hypothesis of inferiority of **Formula 2173** can be rejected and it can be concluded that the test preparation **Formula 2173** is non-inferior to **propan-1-ol 60%**.

Conclusion:

The product **Formula 2173** is suitable to be used as surgical hand disinfection for **immediate effect** under test conditions: EN 12791:2016+A1:2017 – application volume 2 x 5 ml/person and application time 2 x 45 s).

The product **Formula 2173** is suitable to be used as surgical hand disinfection for **3 h effect** under test conditions: EN 12791:2016+A1:2017 – application volume 2 x 3 ml/person and application time 2 x 2.5 min, wearing surgical gloves for 3 h following disinfection.

The test report S362-1/2019 issued on 11.1.2021 was issued again on 3.3.2021 upon the client's request for the more detailed test procedure. The test report S362-1/2019 was issued again on 30.11.2021 upon the client's request for the correction of the active substance. The test report S362-1/2019 was issued again on 11.1.2022 upon the client's request for the correction of the batch number.

11.1.2022, Hodonín

Approved by: Ing. Barbora Stoklásková, Leader of Study





Sainghin en Mélançois, le 30 Novembre 2021
Sainghin en Mélançois, on the November 30th 2021

1ère édition : 24/06/2020

First edition : 24/06/2020

Rapport d'essai : N° A 20 64 13624 **M**

*Test report : N° A 20 64 13624 **M***

1. Objet de la demande (Study Number) n° 39153

Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité levuricide de la formule **2173**. Méthode d'essai et prescriptions (phase 2 - étape 1) NF EN 13624* (Novembre 2013). Application aux désinfectants chimiques pour le lavage hygiénique des mains.

Indice de classement T 72-600.

Méthode par dilution neutralisation.

*Chemical antiseptics and disinfectants. Quantitative suspension test for the evaluation of the yeasticidal activity of the formula **2173**. Test method and prescriptions (phase 2 - step 1) according to NF EN 13624* (November 2013). Application to chemical disinfectants for the hygienic handwash.
Classification index T 72-600.*

Method by dilution neutralisation.

Annule et remplace le rapport A 20 64 13624 du 24/06/2020

Annul and replace the report A 20 64 13624 of 24/06/2020

Ce rapport d'essai ne concerne que le produit (cité ci après) soumis à l'essai tel qu'il a été reçu.

This trial report concerns only the product (quoted this later) subjected on approval, as it has been received.

Ce document comporte 8 pages numérotées dont 1 annexe de 1 page

This report is made of 8 numbered pages including 1 annex of 1 page

La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous la forme de fac- similé photographique intégral. Seule la version électronique fait foi.

The reproduction of this trial report is authorized only under the shape of complete photographic reproduction

Only the electronic version is valid.

* Les données fournies par le client sont identifiées par un astérisque.

* *Datas provided by the customer are identified with an asterisk.*

Laboratoires ANIOS SAS

Adresse : 1 rue de l'espoir - 59260 Lezennes

Tél. +33 3 20 67 67 67 - Fax : + 33 3 20 67 67 68

SIREN : 823 326 061 - SIRET :

VAT : FR71823326061 - Capital Social : 773 630 132 euros

Version I du 03/03/2020

2. Sommaire (Summary)

| | |
|---|---|
| 1. Objet de la demande (<i>Study Number</i>) n° 39153 | 1 |
| 2. Sommaire (<i>Summary</i>) | 2 |
| 3. Introduction (<i>Introduction</i>) | 3 |
| 4. Identification de l'échantillon (<i>Sample Identification</i>) | 3 |
| 5. Méthode expérimentale (<i>Experimental Method</i>) | 4 |
| 5.1. Conditions expérimentales (<i>Experimental conditions</i>) | 4 |
| 5.2. Méthode par dilution neutralisation (<i>Method by dilution neutralisation</i>) | 4 |
| 6. Résultats (<i>Results</i>) | 5 |
| 6.1. Essais de validation des conditions expérimentales (<i>Validation tests</i>) | 5 |
| 6.2. Essais d'activité levuricide (<i>Evaluation of yeasticidal activity</i>) | 6 |
| 7. Conclusion (Conclusion) | 6 |
| 8. Annexe - Données expérimentales (Experimental Data) | 7 |

3. Introduction (Introduction)

L'essai a été réalisé selon la méthode d'essai décrite dans la norme européenne EN 13624 « Désinfectants chimiques et antiseptiques- Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide en médecine (phase 2 /Etape 1) » .

Détermination de l'activité levuricide dans les conditions de laboratoire définies par la présente norme européenne .

The test was realised according to the test method described in the European standard EN 13624 « Chemical disinfectants and antiseptics- Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal in the medical area».

Determination of the yeasticidal activity in the laboratory conditions defined in the present European standard .

Le rapport ci-après a été modifié en page 3/11 car une erreur concernant la déclaration en substance active biocide pour les anciens produits à base de CHDG a été identifiée. La composition du produit n'a pas changé. Cette modification n'a pas d'impact sur la conclusion du rapport.

The following report has been modified on page 3/11 because an error concerning the declaration of biocidal active substance for old CHDG based products has been identified. The composition of the product has not changed.

This change has no impact on the conclusion of the report.

4. Identification de l'échantillon (Sample Identification)

| | |
|--|--|
| Code formule* | 2173 |
| <i>Code formula*</i> | |
| Numéro d'identification de l'échantillon | 3217 20 05 13624 |
| <i>Identification of the sample</i> | |
| Numéro de lot* | C07162 |
| <i>Batch number*</i> | |
| Nom du client* | Charline ROCHE |
| <i>Customer's name*</i> | |
| Fabricant* | Laboratoires ANIOS |
| <i>Manufacturer*</i> | |
| Date de réception au laboratoire | Le 23/04/20 |
| <i>Receipt date at the laboratory</i> | <i>On the 23/04/20</i> |
| Description de l'échantillon | Solution Rose |
| <i>Description of the sample</i> | <i>Pink solution</i> |
| Conditions de stockage au laboratoire* | T° ambiante et obscurité |
| <i>Storage conditions at the laboratory*</i> | <i>Room temperature and darkness</i> |
| Substances actives* | 100 g product contains: (3,76 g) D-gluconic acid, compound with N,N"-bis(4-chlorophenyl)-3,12-diimino-2,4,11,13-tetraazatetradecanediamidine (2:1) (CHDG ; CAS number: 18472-51-0) |
| <i>Activ substances*</i> | |
| Période d'essai | Du 13/05/20 au 15/05/20 |
| <i>Period of analysis</i> | <i>From 13/05/20 to 15/05/20</i> |

5. Méthode expérimentale (Experimental Method)

5.1. Conditions expérimentales (Experimental conditions)

| | |
|---|--|
| Température de l'essai* | 20°C ± 1°C |
| <i>Test temperature*</i> | |
| Temps de contact* | 30 secondes ± 5s |
| <i>Contact Time*</i> | |
| Diluant de la formule lors des essais | Eau dure |
| <i>Diluent of the formula used during the test</i> | <i>Hard water</i> |
| Apparence de la formule et de ses dilutions | Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai |
| <i>Appearance formula dilutions</i> | <i>Preparation physically homogeneous and stable during test</i> |
| Souche testée* | ○ Candida albicans DSM 1386 (équivalent ATCC 10231) |
| <i>Tested strain*</i> | |
| Pourcentage de spores échinulées | Non concerné |
| <i>Spiny spores percentage</i> | <i>Not concerned</i> |
| Substance interférente* | Albumine bovine à 3g/l + 3ml/l érythrocytes |
| <i>Interfering substance*</i> | <i>3 g/l BSA + 3ml/l erythrocytes</i> |
| Stabilité du mélange formule et substances interférentes | Absence de précipité pendant l'essai |
| <i>Stability of the mixture (formula and interfering substance)</i> | <i>Precipitate absent throughout the test</i> |
| Température d'incubation | 30°C ± 1°C |
| <i>Incubation temperature</i> | <i>30°C ± 1°C</i> |

5.2. Méthode par dilution neutralisation (Method by dilution neutralisation)

| | |
|---|--------------------------|
| Nature du neutralisant utilisé | ○ Formule : F 010 |
| <i>Nature of the neutralizer agent used</i> | ○ <i>Formula : F 010</i> |
| Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement | 10% |
| <i>Neutralizer agent added to the counting medium</i> | <i>10%</i> |

6. Résultats (Results)

6.1. Essais de validation des conditions expérimentales (Validation tests)

Vérification de la méthodologie et validation de la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **50%** de la formule **2173** soumise à l'essai.

*Checking of the method and validation of the method by dilution neutralisation for the **50%** test concentration of the formula **2173** to be tested.*

| Souche testée | Nombre de cellules viables (UFC/ml) (Number of viable cells(CFU/ml)) | | | | | | | |
|-------------------------|--|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--|
| | Suspension d'essai | Suspension d'essai / 10 | Suspension de validation | Suspension de validation / 10 | Suspension de validation B | Validation conditions expérimentales | Non toxicité du neutralisant | Inactivation par dilution neutralisation |
| Tested strain | Test suspension | Test suspension / 10 | Validation suspension | Validation suspension / 10 | Validation suspension B | Experimental conditions control | Neutralizer toxicity control | Dilution neutralization control |
| | N | N ₀ | N _v | N _{v0} | N _{vB} | A | B | C |
| Candida albicans | 1,6.10 ⁷ | 1,6.10 ⁶ | 4,3.10 ² | 4,3.10 ¹ | 4,6.10 ⁴ | 3,8.10 ¹ | 3,4.10 ¹ | 3,9.10 ¹ |

Pour la souche soumise à l'essai - For the tested strain.

N est compris entre 1,5 x 10⁷ UFC/ml et 5 x 10⁷ UFC/ml
is comprised between 1.5 x 10⁷ CFU/ml and 5 x 10⁷ CFU/ml

N₀ est compris entre 1,5 x 10⁶ UFC/ml et 5 x 10⁶ UFC/ml
is comprised between 1.5 x 10⁶ CFU/ml and 5 x 10⁶ CFU/ml

N_v est compris entre 3 x 10² UFC/ml et 1.6 x 10³ UFC/ml
is comprised between 3 x 10² CFU/ml and 1.6 x 10³ CFU/ml

N_{v0} est compris entre 3 x 10¹ UFC/ml et 1.6 x 10² UFC/ml
is comprised between 3 x 10¹ CFU/ml and 1.6 x 10² CFU/ml

N_{vB} est compris entre 3 x 10⁴ UFC/ml et 1.6 x 10⁵ UFC/ml
is comprised between 3 x 10⁴ CFU/ml and 1.6 x 10⁵ CFU/ml

B est supérieur ou égal à 0,0005 x N_{vB}
are higher or equal to 0,0005 x N_{vB}

A,C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x N_{v0}
are higher or equal to 0.5 x N_{v0}

La neutralisation est validée avec la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **50%** de la formule **2173** et pour la souche soumise à l'essai.

The neutralization is validated with the method by dilution neutralisation for the **50%** test concentration of the formula **2173** and for the tested strain.

6.2. Essais d'activité levuricide (*Evaluation of yeasticidal activity*)

| | | | |
|-------------------------|--|---------------------|---------------------|
| Souche testée | Nombre de cellules viables (UFC/ml) pour le mélange d'essai (Na) pour les concentrations de : %(v/v) | | |
| Tested strain | Number of the viable cells (CFU/ml) for the test mixture (Na) for the concentrations of : %(v/v) | | |
| | 5 | 25 | 50 |
| Candida albicans | 9,4.10 ⁴ | 9,8.10 ³ | 7,5.10 ³ |

| | | | |
|-------------------------|---|------------|------------|
| | Réduction du nombre de cellule viables à la concentration d'essai. R = Log N0 - Log Na | | |
| | Reduction of the number of viable cells at the test concentration. R = Log N0 - Log Na | | |
| | 5 | 25 | 50 |
| Candida albicans | 1,2 | <u>2,2</u> | <u>2,3</u> |

7. Conclusion (Conclusion)

Selon la norme NF EN 13624 (novembre 2013), la formule **2173**, lorsqu'elle est diluée à la concentration de **25%** (v/v) dans de l'eau dure, présente une activité levuricide en **30 secondes** de contact à 20°C en conditions de saleté, vis-à-vis de la souche de référence pour le lavage hygiénique des mains : ***Candida albicans***.

According to the European standard NF EN 13624 (november 2013), the formula **2173**, when diluted at the concentration of **25 %** (v/v) in hard water, presents a yeasticidal activity in a **30 seconde** contact time at 20°C in dirty conditions against the referenced strain for the hygienic handwash : ***Candida albicans***.

8. Annexe - Données expérimentales (Experimental Data)

Candida albicans - 30 secondes

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME EN 13624 méthode par
dilution-neutralisation Novembre 2013

Réf: F5311F
Date: 27/11/17

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME EN 13624 méthode par
dilution-neutralisation Novembre 2013

Réf: F5311F
Date: 27/11/17

Numéro d'identification: **3217 20 05 13624**

Date: **13.05.20**

Type de produit testé: Lavage hygiénique

Méthode utilisée: Classique

Numéro d'identification: **3217 20 05 13624**

Dénombrement de la suspension bactérienn

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC/boite | | | |
|--|-----------------------------------|------------------------|-------------|-------------|
| | Dilution -5 | Dilution -6 | Dilution -5 | Dilution -6 |
| Candida albicans DSM 1386 (équivalent ATCC 10231) | 155 | 16 | 155 | 16 |
| | 158 | 18 | 158 | 18 |
| Lecture intermédiaire 20 à 24 heures | | Lecture 42 à 48 heures | | |

| | | | | |
|-----|---|-----------------------------|---------------------------|--------|
| Nv | C | $\frac{850}{2} = 4,3E+02$ | N _{v0} = 4,3E+01 | UFC/mL |
| NvB | C | $\frac{92000}{2} = 4,6E+04$ | | UFC/mL |
| A | C | $\frac{75}{2} = 3,8E+01$ | | UFC/mL |
| B | C | $\frac{67}{2} = 3,4E+01$ | | UFC/mL |
| C | C | $\frac{78}{2} = 3,9E+01$ | | UFC/mL |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boites considérées..... 347
 n1 : nombre de boites prises en compte à la première dilution 2
 n2 : nombre de boites prises en compte à la deuxième dilution 2
 d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte : 5
 Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{347}{(2 + 0,1 \times 2) \times 5} = 1,6E+07$ UFC/ml N0=N/10= 1,6E+06

Interprétation :
 N est compris entre 1,5.10⁷ UFC/ml et 5.10⁷ UFC/ml 1,6E+07 Oui
 Nv est compris entre 3.10² et 1,6.10³ 4,3E+02 Oui
 NvB est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 4,6E+04 Oui
 N0 est compris entre 3.10¹ et 1,6.10² 4,3E+01 Oui
 A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x N0 3,8E+01 et 3,9E+01 Oui
 B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB 3,4E+01 Oui
La neutralisation est validée : Oui

$$5 < Q = \frac{\sum dil - 5 / 2}{\sum dil - 6 / 2} < 15 = \frac{156,5}{17} = 9,2$$

Essai de validation : Temps de contact : **NL 30"** **Essai :** Temps de contact : **NL 30"**

| | 14 à 330 UFC/boite | | 14 à 330 UFC/boite | | Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 10ml de la fiole à 50% en ED | | 50 ml de la fiole à 50% en ED | | 62,5 ml | |
|--|--------------------|----|--------------------|----|--|----|------------------------------|----|-------------------------------|----|---------|----|
| | | | | | Concentration produit % | | 5 | 25 | 50 | | | |
| Nv : témoin suspension | 45 | 45 | 40 | 40 | 0 | + | + | + | + | + | + | |
| | 49 | 49 | 43 | 43 | Lecture intermédiaire 20 à 24 heures de 14 à 330 UFC par boîte | -1 | + | + | 87 | 97 | 73 | 76 |
| | 39 | 39 | 36 | 36 | | -2 | 89 | 99 | 14 | 18 | 10 | 12 |
| A : témoin des conditions expérimentales | 35 | 35 | 32 | 32 | Lecture 42 à 48 heures de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | + | + | + | |
| | 41 | 41 | 37 | 37 | | -1 | + | + | 87 | 97 | 73 | 76 |
| | 37 | 37 | | | | -2 | 89 | 99 | 14 | 18 | 10 | 12 |

Calculs Nv = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml). N_{v0}, A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml).

NvB = $\frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml).

C : somme des valeurs Vc prises en compte n : nombre de boîtes considérées

| | | | |
|---|--------------|---------|---------|
| Na = $\frac{C \times 10}{n} \times dilution$ | 9,4E+04 | 9,8E+03 | 7,5E+03 |
| Log N0 = 6,2 | Log Na = 5,0 | 4,0 | 3,9 |
| Calcul de réduction = Log N ₀ - Log Na = Log R | 1,2 | 2,2 | 2,3 |

SUITE A DONNER :
 VISA : Conforme

Direction Scientifique

Liste des signataires du document



Nom_utilisateur : Sophie Bouvaine
Titre : Principal Lab Technician
Date : mercredi, 22 décembre 2021, 13:51 Paris
Signification : Validation de document



Nom_utilisateur : Chrystele Pluchart
Titre : Lead Microbiologist
Date : mercredi, 22 décembre 2021, 14:24 Paris
Signification : Validation de document

Fin de rapport

N Demande : 39153
Rapport d'essai : A 20 64 13624
Etude : NF EN 13624
Date du document : 24/06/2020

Sainghin en Mélançois, le 30 Novembre 2021
Sainghin en Mélançois, on the November 30th 2021

1ère édition : 24/06/2020

First edition : 24/06/2020

Rapport d'essai : N° A 20 66 13727 **M**

*Test report : N° A 20 66 13727 **M***

1. Objet de la demande (Study Number) n° 39155

Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de la formule **2173**. Méthode d'essai et prescriptions (phase 2 - étape 1) NF EN 13727 + A2* (Décembre 2015). Application aux désinfectants pour le lavage hygiénique des mains.

Indice de classement T 72-175.
Méthode par dilution neutralisation.

*Chemical antiseptics and disinfectants. Quantitative suspension test for the evaluation of the bactericidal activity of the formula **2173**. Test method and prescriptions (phase 2 - step 1) according to NF EN 13727 + A2* (December 2015). Application to chemical disinfectants for the hygienic handwash.
Classification index T 72-175.*

Method by dilution neutralisation.

Annule et remplace le rapport A 20 66 13727 du 24/06/2020

Annul and replace the report A 20 66 13727 of 24/06/2020

Ce rapport d'essai ne concerne que le produit (cité ci après) soumis à l'essai tel qu'il a été reçu.
This trial report concerns only the product (quoted this later) subjected on approval, as it has been received.

Ce document comporte 11 pages numérotées dont 1 annexe de 4 pages
This report is made of 11 numbered pages including 1 annex of 4 pages

La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous la forme de fac- similé photographique intégral. Seule la version électronique fait foi.
*The reproduction of this trial report is authorized only under the shape of complete photographic reproduction
Only the electronic version is valid.*

* Les données fournies par le client sont identifiées par un astérisque.

* *Datas provided by the customer are identified with an asterisk.*

Laboratoires ANIOS SAS

Adresse : 1 rue de l'espoir – 59260 Lezennes
Tél. +33 3 20 67 67 67 – Fax : + 33 3 20 67 67 68
SIREN : 823 326 061 – SIRET :
VAT : FR71823326061 – Capital Social : 773 630 132 euros

Version H du 03/03/2020

2. Sommaire (*Summary*)

| | |
|---|---|
| 1. Objet de la demande (<i>Study Number</i>) n° 39155 | 1 |
| 2. Sommaire (<i>Summary</i>) | 2 |
| 3. Introduction (<i>Introduction</i>) | 3 |
| 4. Identification de l'échantillon (<i>Sample Identification</i>) | 3 |
| 5. Méthode expérimentale (<i>Experimental Method</i>) | 4 |
| 5.1. Conditions expérimentales (<i>Experimental conditions</i>) | 4 |
| 5.2. Méthode par dilution neutralisation (<i>Method by dilution neutralisation</i>) | 4 |
| 6. Résultats (<i>Results</i>) | 5 |
| 6.1. Essais de validation des conditions expérimentales (<i>Validation tests</i>) | 5 |
| 6.2. Essais d'activité bactéricide (<i>Evaluation of bactericidal activity</i>) | 6 |
| 7. Conclusion (<i>Conclusion</i>) | 6 |
| 8. Annexe - Données expérimentales (<i>Experimental Data</i>) | 7 |

3. Introduction (Introduction)

L'essai a été réalisé selon la méthode d'essai décrite dans la norme européenne EN 13727 + A2 « Désinfectants chimiques et antiseptiques- Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide en médecine (phase 2 /Etape 1) » .

Détermination de l'activité bactéricide dans les conditions de laboratoire définies par la présente norme européenne .

The test was realised according to the test method described in the European standard EN 13727 + A2 « Chemical disinfectants and antiseptics- Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area».

Determination of the bactericidal activity in the laboratory conditions defined in the present European standard .

Le rapport ci-après a été modifié en page 3/11 car une erreur concernant la déclaration en substance active biocide pour les anciens produits à base de CHDG a été identifiée. La composition du produit n'a pas changé. Cette modification n'a pas d'impact sur la conclusion du rapport.

The following report has been modified on page 3/11 because an error concerning the declaration of biocidal active substance for old CHDG based products has been identified. The composition of the product has not changed.

This change has no impact on the conclusion of the report.

4. Identification de l'échantillon (Sample Identification)

| | |
|--|--|
| Code formule* | 2173 |
| Code formula* | |
| Numéro d'identification de l'échantillon | 3003 20 04 13727 |
| Identification of the sample | |
| Numéro de lot* | C 071 62 |
| Batch number* | |
| Nom du client* | Charline ROCHE |
| Customer's name* | |
| Fabricant* | Laboratoires ANIOS |
| Manufacturer* | |
| Date de réception au laboratoire | Le 23/04/20 |
| Receipt date at the laboratory | On the 23/04/20 |
| Description de l'échantillon | Solution Rose |
| Description of the sample | Pink Solution |
| Conditions de stockage au laboratoire* | T° ambiante et obscurité |
| Storage conditions at the laboratory* | Room temperature and darkness |
| Substances actives | 100 g product contains: (3,76 g) D-gluconic acid, compound with N,N"-bis(4-chlorophenyl)-3,12-diimino-2,4,11,13-tetraazatetradecanediamidine (2:1) (CHDG ; CAS number: 18472-51-0) |
| Activ substances | |
| Période d'essai | Du 23/04/20 au 18/05/20 |
| Period of analysis | From 23/04/20 to 18/05/20 |

5. Méthode expérimentale (*Experimental Method*)

5.1. Conditions expérimentales (*Experimental conditions*)

| | |
|---|---|
| Température de l'essai* | 20°C ± 1°C |
| <i>Test temperature*</i> | |
| Temps de contact* | 30 secondes ± 5s |
| <i>Contact Time*</i> | |
| Diluant de la formule lors des essais | Eau dure |
| <i>Diluent of the formula used during the test</i> | <i>Hard water</i> |
| Apparence de la formule et de ses dilutions | Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai |
| <i>Appearance formula dilutions</i> | <i>Preparation physically homogeneous and stable during test</i> |
| Souches testées* | <ul style="list-style-type: none">○ Pseudomonas aeruginosa CIP 103467 (équivalent ATCC 15442)○ Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC 10541)○ Escherichia coli K12 CIP 54117○ Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent ATCC 6538) |
| <i>Tested strains*</i> | |
| Substance interférente* | Albumine bovine à 3g/l + 3ml/l érythrocytes |
| <i>Interfering substance*</i> | <i>3 g/l BSA + 3ml/l erythrocytes</i> |
| Stabilité du mélange formule et substances interférentes | Absence de précipité pendant l'essai |
| <i>Stability of the mixture (formula and interfering substance)</i> | <i>Precipitate absent throughout the test</i> |
| Température d'incubation | 37°C ± 1°C |
| <i>Incubation temperature</i> | <i>37°C ± 1°C</i> |

5.2. Méthode par dilution neutralisation (*Method by dilution neutralisation*)

| | |
|---|---|
| Nature du neutralisant utilisé | <ul style="list-style-type: none">○ Formule : F010 |
| <i>Nature of the neutralizer agent used</i> | <ul style="list-style-type: none">○ <i>Formula : F010</i> |
| Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement | 10% |
| <i>Neutralizer agent added to the counting medium</i> | <i>10%</i> |

6. Résultats (Results)

6.1. Essais de validation des conditions expérimentales (Validation tests)

Vérification de la méthodologie et validation de la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **50%** de la formule **2173** soumise à l'essai.

Checking of the method and validation of the method by dilution neutralisation for the **50%** test concentration of the formula **2173** to be tested.

| Souches testées | Nombre de cellules viables (UFC/ml) (Number of viable cells(CFU/ml)) | | | | | | | |
|-------------------------------|--|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--|
| | Suspension d'essai | Suspension d'essai / 10 | Suspension de validation | Suspension de validation / 10 | Suspension de validation B | Validation conditions expérimentales | Non toxicité du neutralisant | Inactivation par dilution neutralisation |
| Tested strains | Test suspension | Test suspension / 10 | Validation suspension | Validation suspension / 10 | B Validation suspension | Experimental conditions control | Neutralizer-toxicity control | Dilution neutralization control |
| | N | N ₀ | N _v | N _{v0} | N _{vB} | A | B | C |
| Pseudomonas aeruginosa | 2,2.10 ⁸ | 2,2.10 ⁷ | 8,5.10 ² | 8,5.10 ¹ | 7,5.10 ⁴ | 7,2.10 ¹ | 7,5.10 ¹ | 6,8.10 ¹ |
| Enterococcus hirae | 1,7.10 ⁸ | 1,7.10 ⁷ | 4,4.10 ² | 4,4.10 ¹ | 4,9.10 ⁴ | 4,6.10 ¹ | 4,6.10 ¹ | 4,6.10 ¹ |
| Escherichia coli K12 | 2,3.10 ⁸ | 2,3.10 ⁷ | 6,5.10 ² | 6,5.10 ¹ | 5,9.10 ⁴ | 5,8.10 ¹ | 5,9.10 ¹ | 5,8.10 ¹ |
| Staphylococcus aureus | 1,6.10 ⁸ | 1,6.10 ⁷ | 3,8.10 ² | 3,8.10 ¹ | 4,7.10 ⁴ | 4,0.10 ¹ | 4,8.10 ¹ | 4,2.10 ¹ |

Pour les souches soumises à l'essai - For the tested strains.

N est compris entre $1,5 \times 10^8$ UFC/ml et 5×10^8 UFC/ml
is comprised between 1.5×10^8 CFU/ml and 5×10^8 CFU/ml

N₀ est compris entre $1,5 \times 10^7$ UFC/ml et 5×10^7 UFC/ml
is comprised between 1.5×10^7 CFU/ml and 5×10^7 CFU/ml

N_v est compris entre 3×10^2 UFC/ml et 1.6×10^3 UFC/ml
is comprised between 3×10^2 CFU/ml and 1.6×10^3 CFU/ml

N_{v0} est compris entre 3×10^1 UFC/ml et 1.6×10^2 UFC/ml
is comprised between 3×10^1 CFU/ml and 1.6×10^2 CFU/ml

N_{vB} est compris entre 3×10^4 UFC/ml et 1.6×10^5 UFC/ml
is comprised between 3×10^4 CFU/ml and 1.6×10^5 CFU/ml

B est supérieur ou égal à $0,0005 \times N_{vB}$
are higher or equal to $0,0005 \times N_{vB}$

A,C sont supérieurs ou égaux à $0,5 \times N_{v0}$
are higher or equal to $0.5 \times N_{v0}$

La neutralisation est validée avec la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **50%** de la formule **2173** et pour les souches soumises à l'essai.

The neutralization is validated with the method by dilution neutralisation for the **50%** test concentration of the formula **2173** and for the tested strains.

6.2. Essais d'activité bactéricide (*Evaluation of bactericidal activity*)

| Souches testées | Nombre de cellules viables (UFC/ml) pour le mélange d'essai (Na) pour les concentrations de : %(v/v) | | |
|-------------------------------|--|-------------|-------------|
| Tested strains | Number of the viable cells (CFU/ml) for the test mixture (Na) for the concentrations of : %(v/v) | | |
| | 5 | 25 | 50 |
| Pseudomonas aeruginosa | $>3,3.10^5$ | $>3,3.10^5$ | $<1,4.10^2$ |
| Enterococcus hirae | $>3,3.10^5$ | $>3,3.10^5$ | $1,4.10^4$ |
| Escherichia coli K12 | $>3,3.10^5$ | $<1,4.10^2$ | $<1,4.10^2$ |
| Staphylococcus aureus | $1,9.10^4$ | $<1,4.10^2$ | $<1,4.10^2$ |

| Souches testées | Réduction du nombre de cellule viables à la concentration d'essai. R = Log N0 - Log Na | | |
|-------------------------------|---|---------|---------|
| Tested strains | Reduction of the number of viable cells at the test concentration. R = Log N0 - Log Na | | |
| | 5 | 25 | 50 |
| Pseudomonas aeruginosa | $< 1,8$ | $< 1,8$ | $> 5,2$ |
| Enterococcus hirae | $< 1,7$ | $< 1,7$ | $3,1$ |
| Escherichia coli K12 | $< 1,9$ | $> 5,3$ | $> 5,3$ |
| Staphylococcus aureus | $2,9$ | $> 5,1$ | $> 5,1$ |

7. Conclusion (Conclusion)

Selon la norme NF EN 13727 + A2 (Décembre 2015), la formule **2173**, lorsqu'elle est diluée à la concentration de 50,00 % (v/v) dans de l'eau dure, présente une activité bactéricide en 30 secondes de contact à 20°C en conditions de saleté, vis-à-vis des souches de référence pour le lavage hygiénique des mains : ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Enterococcus hirae***, ***Escherichia coli K12***, ***Staphylococcus aureus***.

According to the European standard NF EN 13727 + A2 (December 2015), the formula **2173**, when diluted at the concentration of 50,00% (v/v) in hard water, presents a bactericidal activity in a 30 second contact time at 20°C in dirty conditions against the referenced strains for the hygienic handwash: ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Enterococcus hirae***, ***Escherichia coli K12***, ***Staphylococcus aureus***.

8. Annexe - Données expérimentales (Experimental Data)

Pseudomonas aeruginosa - 30 secondes

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250K
Date : 27/11/17

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250K
Date : 27/11/17

Numéro d'identification: **3003 20 04 13727** Date : **12.05.20**
Type de produit testé : Lavage hygiénique
Méthode utilisée : Classique
Température : Inférieure à 40°C
Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boîte | | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|-------------|------------------------|-------------|
| | Dilution -6 | Dilution -7 | Dilution -6 | Dilution -7 |
| Pseudomonas aeruginosa CIP | 218 | 22 | 218 | 22 |
| 103467 (équivalent ATCC 15442) | 204 | 36 | 204 | 36 |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | |

Numéro d'identification: **3003 20 04 13727**

| | | | | | | | |
|-----|---|--------------------|---|---------|------------------|---------|--------|
| Nv | C | $\frac{1690}{2}$ | = | 8,5E+02 | N ₀ = | 8,5E+01 | UFC/mL |
| NvB | C | $\frac{150000}{2}$ | = | 7,5E+04 | | | UFC/mL |
| A | C | $\frac{143}{2}$ | = | 7,2E+01 | | | UFC/mL |
| B | C | $\frac{150}{2}$ | = | 7,5E+01 | | | UFC/mL |
| C | C | $\frac{136}{2}$ | = | 6,8E+01 | | | UFC/mL |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 480
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution 2
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution 2
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte : 10⁶
Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{2,2E+08}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^6} = 2,2E+07$ UFC/ml N₀=N/10⁶ = 2,2E+07

Interprétation :
N est compris entre 1,5.10⁸ UFC/ml et 5.10⁸ UFC/ml 2,2E+08 Oui
Nv est compris entre 3.10² et 1,6.10³ 8,5E+02 Oui
NvB est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 7,5E+04 Oui
Nv0 est compris entre 3.10¹ et 1,6.10² 8,5E+01 Oui
A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 7,2E+01 et 6,8E+01 Oui
B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB 7,5E+01 Oui
La neutralisation est validée : Oui

$$5 < Q = \frac{\sum dil - 6 / 2}{\sum dil - 7 / 2} < 15 = \frac{211}{29} = 7,3$$

Essai de validation : Temps de contact : **VD 30"** **Essai :** Temps de contact : **VD 30"**

| | De 14 à 330 UFC par boîte | | De 14 à 330 UFC par boîte | | Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 10mL de la fiole à 62,5 | | 50mL de la fiole à 62,5 | | 62,5 | |
|--|---------------------------|----|---------------------------|----|--|----|-------------------------|---|-------------------------|---|------|---|
| | | | | | Concentration produit % | | 5 | | 25 | | 50 | |
| Nv : témoin suspension | 82 | 82 | 87 | 87 | Dénombrement à 20h/24h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | + | + | 0 | 0 |
| | | | | | | -1 | + | + | + | + | 0 | 0 |
| | | | | | | -2 | + | + | + | + | 0 | 0 |
| NvB : témoin suspension B | 78 | 78 | 72 | 72 | Dénombrement à 40h/48h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | + | + | 0 | 0 |
| | | | | | | -1 | + | + | + | + | 0 | 0 |
| | | | | | | -2 | + | + | + | + | 0 | 0 |
| A : témoin des conditions expérimentales | 68 | 68 | 75 | 75 | $Na = \frac{C \times 10}{n} \times dilution > 3,3E+05 > 3,3E+05 < 1,4E+02$ | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| B : témoin de non-toxicité du neutralisant | 68 | 68 | 82 | 82 | $Log N_0 = 7,3 \quad Log Na = 5,5 \quad 5,5 \quad 2,1$ | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 50 % | 69 | 69 | 67 | 67 | $\text{Calcul de réduction} = Log N_0 - Log Na < 1,8 < 1,8 > 5,2$ | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | | | | | | | | |

Calculs Nv = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml). N₀, A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml).

NvB = $\frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml).

C : somme des valeurs Vc prises en compte n : nombre de boîtes considérées

SUITE A DONNER :
VISA : Conforme

Enterococcus hirae - 30 secondes

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250K
Date : 27/11/17

Numéro d'identification: **3003 20 04 13727** Date : **23.04.20**
Type de produit testé : Lavage hygiénique
Méthode utilisée : Classique
Température : Inférieure à 40°C
Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boîte | | | |
|--|---------------------------------------|-------------|------------------------|-------------|
| | Dilution -6 | Dilution -7 | Dilution -6 | Dilution -7 |
| Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC 10541) | 157 | 17 | 157 | 17 |
| | 177 | 14 | 177 | 14 |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 365
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution 2
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution 2
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte :10⁶
Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{365}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^6} = 1,7E+08$ UFC/ml $N_0 = N \times 10^6 = 1,7E+07$

$$5 < Q = \frac{\sum dil - 6 / 2}{\sum dil - 7 / 2} < 15 = \frac{167}{15,5} = 10,8$$

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation *Décembre 2015*

Réf : FS250K
Date : 27/11/17

Numéro d'identification: **3003 20 04 13727**

| | | | | | |
|-----|---|-----------------------------|------------------|---------|--------|
| Nv | C | $\frac{880}{2} = 4,4E+02$ | N ₀ = | 4,4E+01 | UFC/mL |
| NvB | C | $\frac{97000}{2} = 4,9E+04$ | | | UFC/mL |
| A | C | $\frac{92}{2} = 4,6E+01$ | | | UFC/mL |
| B | C | $\frac{92}{2} = 4,6E+01$ | | | UFC/mL |
| C | C | $\frac{91}{2} = 4,6E+01$ | | | UFC/mL |

Interprétation :
N est compris entre 1,5.10⁸ UFC/ml et 5.10⁸ UFC/ml 1,7E+08 Oui
Nv est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 4,4E+02 Oui
NvB est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 4,9E+04 Oui
Nv0 est compris entre 3.10¹ et 1,6.10² 4,4E+01 Oui
A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 4,6E+01 et 4,6E+01 Oui
B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB 4,6E+01 Oui
La neutralisation est validée : Oui

Essai de validation : Temps de contact : **VL** **30"** **Essai :** Temps de contact : **VL** **30"**

| | De 14 à 330 UFC par boîte | | De 14 à 330 UFC par boîte | | Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 10ml de la fiole à 50% | | 50ml de la fiole à 50% | | 62,5 | |
|--|--|---|--|----|---|----------|------------------------|----|------------------------|-----|---------|--|
| | 47 | | 47 | | Concentration produit % | | 5 | | 25 | | 50 | |
| Nv : témoin suspension | 41 | 41 | | | 0 | + | + | + | + | + | + | |
| NvB : témoin suspension B | 52 | 52 | Dénombrement à 20h/24h de 14 à 330 UFC par boîte | -1 | + | + | + | + | 129 | 146 | | |
| | 45 | 45 | | -2 | + | + | + | + | 15 | 11 | | |
| A : témoin des conditions expérimentales | 49 | 49 | Dénombrement à 40h/48h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | + | + | + | + | | |
| | 43 | 43 | | -1 | + | + | + | + | 129 | 146 | | |
| B : témoin de non-toxicité du neutralisant | 46 | 46 | -2 | + | + | + | + | 15 | 11 | | | |
| | 46 | 46 | | | | | | | | | | |
| C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 50 % | 40 | 40 | | | | | | | | | | |
| | 51 | 51 | | | | | | | | | | |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | Na = $\frac{C \times 10}{n} \times dilution$ | > | 3,3E+05 | > | 3,3E+05 | | 1,4E+04 | |
| Calculs | Nv = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml). | N ₀ , A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml). | | | Log N0 = 7,2 | Log Na = | 5,5 | | 5,5 | | 4,1 | |
| | NvB = $\frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml). | | | | Calcul de réduction = Log N ₀ - Log Na = Log R | < | 1,7 | < | 1,7 | | 3,1 | |

C : somme des valeurs Vc prises en compte n : nombre de boîtes considérées

SUITE A DONNER :
VISA : Conforme

Escherichia coli K12 - 30 secondes

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation Décembre 2015

Ref : FS250K
Date : 27/11/17

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation Décembre 2015

Ref : FS250K
Date : 27/11/17

Numéro d'identification: **3003 20 04 13727** Date : **14.05.20**
Type de produit testé : Lavage hygiénique
Méthode utilisée : Classique
Température : Inférieure à 40°C
Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boîte | | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|-------------|------------------------|-------------|
| | Dilution -6 | Dilution -7 | Dilution -6 | Dilution -7 |
| Escherichia coli K12 CIP 54117 | 233 | 21 | 233 | 21 |
| | 231 | 29 | 231 | 29 |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | |

Numéro d'identification: **3003 20 04 13727**

| | | | | | | | |
|-----|---|--------------------|---|---------|------------------|---------|--------|
| Nv | C | $\frac{1290}{2}$ | = | 6,5E+02 | N ₀ = | 6,5E+01 | UFC/mL |
| NvB | C | $\frac{118000}{2}$ | = | 5,9E+04 | | | UFC/mL |
| A | C | $\frac{115}{2}$ | = | 5,8E+01 | | | UFC/mL |
| B | C | $\frac{117}{2}$ | = | 5,9E+01 | | | UFC/mL |
| C | C | $\frac{116}{2}$ | = | 5,8E+01 | | | UFC/mL |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 514
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution 2
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution 2
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte : 10⁶
Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{514}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^6} = 2,3E+08$ UFC/ml N₀=N/10⁶= 2,3E+07

Interprétation :
N est compris entre 1,5.10⁸ UFC/ml et 5.10⁸ UFC/ml 2,3E+08 Oui
Nv est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 6,5E+02 Oui
NvB est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 5,9E+04 Oui
Nv0 est compris entre 3.10¹ et 1,6.10² 6,5E+01 Oui
A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 5,8E+01 et 5,8E+01 Oui
B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB 5,9E+01 Oui
La neutralisation est validée : Oui

$$5 < Q = \frac{\sum dil - 6 / 2}{\sum dil - 7 / 2} < 15 = \frac{232}{25} = 9,3$$

Essai de validation : Temps de contact : **VD 30"** Essai : Temps de contact : **VD 30"**

| | De 14 à 330 UFC par boîte | | De 14 à 330 UFC par boîte | | Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 10ml fiole à 50% | | 50ml Fiole à 50% | | 62,5 | |
|--|---------------------------|----|---------------------------|----|---|----|------------------|---------|------------------|---------|------|---------|
| | | | | | | | | | | | | |
| Nv : témoin suspension | 61 | 61 | 68 | 68 | Concentration produit % | | 5 | | 25 | | 50 | |
| | | | | | Dénombrement à 20h/24h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| NvB : témoin suspension B | 56 | 56 | 62 | 62 | | -1 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | -2 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A : témoin des conditions expérimentales | 61 | 61 | 54 | 54 | Dénombrement à 40h/48h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | -1 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B : témoin de non-toxicité du neutralisant | 66 | 66 | 51 | 51 | | -2 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | | | | | |
| C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 50 % | 62 | 62 | 54 | 54 | Na = $\frac{C \times 10}{n} \times dilution$ | | > | 3,3E+05 | < | 1,4E+02 | < | 1,4E+02 |
| | | | | | Log N ₀ = 7,4 | | | 5,5 | | 2,1 | | 2,1 |
| | | | | | Calcul de réduction = Log N ₀ - Log Na = Log R | | < | 1,9 | > | 5,3 | > | 5,3 |

Calculs Nv = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml). N₀, A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml).

NvB = $\frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml).

C : somme des valeurs Vc prises en compte n : nombre de boîtes considérées

SUITE A DONNER :
VISA : Conforme

Staphylococcus aureus - 30 secondes

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation Décembre 2015

Ref : FS250K
Date : 27/11/17

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13727 + A2
méthode par dilution-neutralisation Décembre 2015

Ref : FS250K
Date : 27/11/17

Numéro d'identification: **3003 20 04 13727** Date : **24.04.20**
Type de produit testé : Lavage hygiénique
Méthode utilisée : Classique
Température : Inférieure à 40°C
Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boîte | | | |
|---|---------------------------------------|-------------|------------------------|-------------|
| | Dilution -6 | Dilution -7 | Dilution -6 | Dilution -7 |
| Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent ATCC 6538) | 159 | 17 | 159 | 17 |
| | 153 | 22 | 153 | 22 |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | |

Numéro d'identification: **3003 20 04 13727**

| | | | | | | | |
|-----|---|-------------------|---|---------|------------------|---------|--------|
| Nv | C | $\frac{760}{2}$ | = | 3,8E+02 | N ₀ = | 3,8E+01 | UFC/mL |
| NvB | C | $\frac{93000}{2}$ | = | 4,7E+04 | | | UFC/mL |
| A | C | $\frac{80}{2}$ | = | 4,0E+01 | | | UFC/mL |
| B | C | $\frac{96}{2}$ | = | 4,8E+01 | | | UFC/mL |
| C | C | $\frac{84}{2}$ | = | 4,2E+01 | | | UFC/mL |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 351
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution 2
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution 2
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte : 10⁶
Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{351}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^6} = 1,6E+08$ UFC/ml N₀=N/10⁶ = 1,6E+07

Interprétation :
N est compris entre 1,5.10⁸ UFC/ml et 5.10⁸ UFC/ml 1,6E+08 Oui
Nv est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 3,8E+02 Oui
NvB est compris entre 3.10⁴ et 1,6.10⁵ 4,7E+04 Oui
NvO est compris entre 3.10¹ et 1,6.10² 3,8E+01 Oui
A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x NvO 4,0E+01 et 4,2E+01 Oui
B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB 4,8E+01 Oui
La neutralisation est validée : Oui

$$5 < Q = \frac{\sum dil - 6 / 2}{\sum dil - 7 / 2} < 15 = \frac{156}{19,5} = 8,0$$

Essai de validation : Temps de contact : **SB 30"** Essai : Temps de contact : **SB 30"**

| | De 14 à 330 UFC par boîte | | De 14 à 330 UFC par boîte | | Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 10 ml de la fiole à 50% | | 50 ml de la fiole à 50% | | 62,5 | |
|--|---------------------------|----|---------------------------|----|---|----|-------------------------|-----|-------------------------|---|---------|---|
| | | | | | | | | | | | | |
| Nv : témoin suspension | 42 | 34 | 42 | 34 | Concentration produit % | | 5 | 25 | 50 | | | |
| NvB : témoin suspension B | 49 | 44 | 49 | 44 | Dénombrement à 20h/24h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | 5 | 3 | 0 | 0 |
| | 49 | 44 | 49 | 44 | | -1 | 208 | 172 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 49 | 44 | 49 | 44 | | -2 | 22 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A : témoin des conditions expérimentales | 37 | 43 | 37 | 43 | Dénombrement à 40h/48h de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | 5 | 3 | 0 | 0 |
| B : témoin de non-toxicité du neutralisant | 49 | 47 | 49 | 47 | | -1 | 208 | 172 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 49 | 47 | 49 | 47 | | -2 | 22 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 50 % | 37 | 47 | 37 | 47 | Na = $\frac{C \times 10}{n} \times dilution$ | | 1,9E+04 | < | 1,4E+02 | < | 1,4E+02 | |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | Log N ₀ = 7,2 | | Log Na = 4,3 | | 2,1 | | 2,1 | |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | | Calcul de réduction = Log N ₀ - Log Na = Log R | | 2,9 | > | 5,1 | > | 5,1 | |

Calculs Nv = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml). N₀, A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml).

NvB = $\frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml).

C : somme des valeurs Vc prises en compte n : nombre de boîtes considérées

SUITE A DONNER :
VISA : Conforme

Direction Scientifique

Liste des signataires du document



Nom_utilisateur : Sophie Bouvaine
Titre : Principal Lab Technician
Date : mercredi, 22 décembre 2021, 13:52 Paris
Signification : Validation de document



Nom_utilisateur : Chrystele Pluchart
Titre : Lead Microbiologist
Date : mercredi, 22 décembre 2021, 14:23 Paris
Signification : Validation de document

Fin de rapport

N Demande : 39155
Rapport d'essai : A 20 66 13727
Etude : NF EN 13727
Date du document : 24/06/2020

HYGIENE NORD GMBH, c/o BIOTECHNIKUM, W.-RATHENAU-STR. 49 A, D-17489 GREIFSWALD

Laboratoires ANIOS SAS

1, rue de l'Espoir

59260 Lezennes

France

CUSTOMER NUMBER
314

DATE
May 11, 2020

REPORT 200781.V2

FORMULA 2173

HYGIENIC HANDWASH (EN 1499:2017)

Objective

The activity of the hygienic handwash product **FORMULA 2173** (Laboratoires ANIOS, Lezennes, France) should be evaluated by a test simulating practical conditions in accordance with the EN 1499 (2017).

This **version 02** of the report replaces the Hygiene Nord GmbH test report 200781.V1, dated May 11, 2020; and corrects the actives on Page 2. The efficacy claim remains unchanged.

Test description

| | |
|-------------------------------|---|
| Order number: | A 20-0305 |
| Manufacturer: | Laboratoires ANIOS, Lille-Hellemmes, France |
| Product: | FORMULA 2173 |
| Batch number: | C071 62 |
| Sample number: | P 202323 |
| Storage conditions: | Room temperature |
| Manufacturer date: | 03 /2020 |
| Best before: | 03 /2022 |
| Date of order: | March 11, 2020 |
| Date of delivery: | April 03, 2020 |
| Test date: | May 07, 2020 – May 08, 2020 |
| Basis: | EN 1499 (2013; correction 2017): Chemical disinfectants and antiseptics – Hygienic handwash – test method and requirements (phase 2, step 2) |
| Test organism: | <i>Escherichia coli</i> K 12 NCTC 10538 |
| Test solutions: | 100 % (50 % and 10 %, for validation) |
| Active ingredients in 100 ml: | (3,76 g) D-gluconic acid, compound with N,N"-bis(4-chlorophenyl)-3,12-diimino-2,4,11,13-tetraazatetradecanediamidine (2:1) (CHDG ; CAS number: 18472-51-0). |
| Odour: | fresh and sweetish |
| Appearance: | pink, slightly viscous liquid |
| Appearance of dilution: | slightly pink liquids |
| pH – value (pH-meter) | 100 %: 5.14 |
| Neutralizer: | 3 % Tween 80 + 3 % saponin + 0.1 % histidine + 0.3 % lecithin + 0.5 % sodium-thiosulfate + 1.429 % ether sulfate 70 % (Neutralizer XVI) |
| Test temperature: | 20 ± 1 °C |
| Incubation temperature: | 36 ± 1 °C |

Test Method

A Latin-Square design was used for the testing of **FORMULA 2173**. The subjects were randomly divided into three groups of approximately the same size. The test was first performed with group 1 using the reference handwash procedure and group 2 using the handwash procedure with the test product **FORMULA 2173**. The test was repeated on the same day, with group 1 applying the handwash procedure with the test product **FORMULA 2173** group 2 using the reference handwash procedure.

The test was performed on 15 healthy persons with hands with healthy skin, without cuts or abrasions, and with short and clean fingernails.

Application of the contamination fluid:

Hands were prepared by washing for 1 min with 5 ml soft soap (according to EN 1499) to remove natural transients and then dried on paper towels. Hands were immersed in the contamination fluid for 5 s and then allowed to dry in the air for 3 min, avoiding the formation of droplets.

Contamination fluid: **2.94*10⁸ cfu / ml**

Prevalues:

Immediately after drying, the fingertips were rubbed (including the thumb) for 1 min on the base of a Petri dish containing 10 ml of TSB (without neutralizer) in order to assess the release of test organisms before treatment of the hands with the test products (prevalues). A separate dish was used for each hand.

Dilutions of 10⁻³ and 10⁻⁴ of these sampling fluids were prepared in TSB. For each dilution, 0.1 ml were plated on the surface of TSA plate. The plates were incubated at 36±1°C for 24 h.

Hygienic handwash procedure:

Reference product (R):

Application: 5 ml of soft soap were poured into wetted cupped hands. Hands were washed in accordance with the standard handwash procedure.

After 60 s, this procedure was completed by a 10 s rinse of the hands under running tap water. Fingertips remained pointing upwards until sampling for postvalues; wrists and lower arms were dried with paper towels by a helper.

Test products (P)

Application: **3 ml** of the test product **FORMULA 2173** is poured into wetted hands. Hands were then washed in accordance with the EN 1499 standard handwash procedure for **30 s**.

According to the test standard, that procedure was completed by a 10 s rinse of the hands under running tap water (cold). Fingertips remained pointing upwards until sampling for postvalues; wrists and lower arms were dried with paper towels by a helper.

Postvalue

After the hygienic handwash procedure the fingertips und thumb tips were rubbed for 1 min on the base of a Petri dish containing 10 ml of TSB (with neutralizer). A separate dish was used for each hand.

1.0 ml and 0.1 ml samples of the undiluted sampling fluid and 0.1 ml of a 10^{-1} dilution in TSB were plated on the surface of TSA plates. The plates were incubated at 36 ± 1 °C for 24 h.

Results

The results are valid as the following requirements according to the EN 1499 (2017) were fulfilled (table 2):

- results of 14 volunteers are available
- the overall mean of the log prevalues for reference and test procedure is at least 5.00
- the absolute difference of mean differences between log reductions of RP and PP of group RP → PP and group PP → RP is be less than 2.00
- no systematic errors were detected by the calculation of the quotients of cfu numbers of consecutive dilutions of the sampling fluids.

The overall mean values of the reference product are:

| | |
|------------------|------|
| prevalue | 5.77 |
| postvalue | 2.91 |
| reduction factor | 2.86 |

The overall mean values of the test product **FORMULA 2173** are:

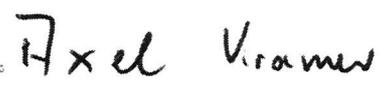
| | |
|------------------|------|
| prevalue | 5.84 |
| postvalue | 2.38 |
| reduction factor | 3.46 |

The mean log reduction (RF) for the test product **FORMULA 2173** is greater than that of the reference product. According to the Wilcoxon-Wilcox statistical test at the required probability level of $p = 0.01$ (1-tailed), this difference is not considered significant (rank sum = 0.00, $p = 0.000$; required: $p \leq 0.01$, tabulated value ≤ 15).

In accordance with these results, the product **FORMULA 2173** is **suitable** for the **hygienic handwash** when hands (wetted with tap water) are kept moist / lathered with **3 ml** of that product for a contact time of **30 s**. **FORMULA 2173** does therefore **correspond** to the requirements of the EN 1499 (2017).

Greifswald, May 11, 2020


Dr. rer. med. (Dipl. Biol.) Torsten Koburger-Janssen
- General Manager -


Prof. Dr. med. A. Kramer
- MD for Hygiene and Environmental Medicine -

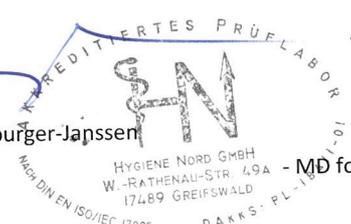


Table 1: Neutralization–control and validation (EN 1499:2017)

| | | | |
|--|--|-------------------------|-------------|
| Date: | May 08, 2020 | Order number: | A 20-0305 |
| Product: | FORMULA 2173 | Sample number: | P 202323 |
| Test organism: | <i>E. coli</i> | Batch number: | C071 62 |
| Interfering substance: | none | Neutralizer: | XVI |
| Incubation temperature: | 36 ± 1 °C | Incubation time: | 24 h – 48 h |
| Test suspension (N): | 2.94*10 ⁸ cfu/ml (8.47 log) | Test temperature | 20 ± 1 °C |
| Validation Suspension (N_v): | 1.53*10 ³ cfu/ml (3.18 log) | | |
| Validation Suspension (N_{vb}): | 1.36*10 ⁵ cfu/ml (5.13 log) | | |

Neutralization – control and validation:

| Validation suspension (N _{v0}) | | | | Neutralizer control (control B) | | | | Method validation (Control C) 50 % | | | |
|---|----|----------------|-------------------------|---|----|----------------|-------------------------|---|----|----------------|-------------------------|
| cfu / Plate 1 & 2 | | V _c | \bar{x} [cfu / ml] | cfu / Plate 1 & 2 | | V _c | \bar{x} [cfu / ml] | cfu / Plate 1 & 2 | | V _c | \bar{x} [cfu / ml] |
| V _{c1} | 88 | 71 | 159 | V _{c1} | 62 | 53 | 115 | V _{c1} | 75 | 78 | 153 |
| V _{c2} | 73 | 74 | 147 | V _{c2} | 60 | 55 | 115 | V _{c2} | 70 | 72 | 142 |
| $30 \leq \bar{x} \text{ of } N_{v0} \leq 160?$ | | | | $\bar{x} \text{ of B is } \geq 0.0005 \bar{x} \text{ of } N_{vb}?$ | | | | $\bar{x} \text{ of C is } \geq 0.5 \bar{x} \text{ of } N_{v0}?$ | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No | | | | <input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No | | | | <input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No | | | |
| Method validation (Control C) 10 % | | | | | | | | | | | |
| cfu / Plate 1 & 2 | | V _c | \bar{x} [cfu / ml] | cfu / Plate 1 & 2 | | V _c | \bar{x} [cfu / ml] | cfu / Plate 1 & 2 | | V _c | \bar{x} [cfu / ml] |
| V _{c1} | 79 | 64 | 143 | V _{c1} | 79 | 64 | 143 | V _{c1} | 79 | 64 | 143 |
| V _{c2} | 71 | 69 | 140 | V _{c2} | 71 | 69 | 140 | V _{c2} | 71 | 69 | 140 |
| $\bar{x} \text{ of C is } \geq 0.5 \bar{x} \text{ of } N_{v0}?$ | | | | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No | | | | | | | | | | | |

Control of group of subjects (EN 1499:2017)

| Group 1 (RP → PP) subjects 1 - 7 | | | Group 2 (PP → RP) subjects 8 – 11 / 13-15 | | | Absolute difference of mean differences |
|---|------|------------|--|------|------------|--|
| mean log ₁₀ RF | | difference | mean log ₁₀ RF | | difference | Abs(-0.67 – (-0.61)) = 0.06 |
| RP | PP | | RP | PP | | |
| 2.80 | 3.47 | -0.67 | 2.92 | 3.52 | -0.61 | |
| $\text{result} < 2.00 ?$ | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No | | | | | | |

Table 2: Hygienic handwash, test results –test product: FORMULA QX 207 19 02

test date: May 07, 2020
 reference: soft soap
 test product: FORMULA 2173
 neutralizer: XVI

order number: A 20-0305
 batch number: C071 62
 sample number: P 202323

| subject | hand | reference product | | | | | test product | | | | |
|---------|-------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | | prevalue [cfu] | | postvalue [cfu] | | | prevalue [cfu] | | postvalue [cfu] | | |
| | | 0.1 ml 10 ⁻³ | 0.1 ml 10 ⁻⁴ | 1 ml 10 ⁰ | 0.1 ml 10 ⁰ | 0.1 ml 10 ⁻¹ | 0.1 ml 10 ⁻³ | 0.1 ml 10 ⁻⁴ | 1 ml 10 ⁰ | 0.1 ml 10 ⁰ | 0.1 ml 10 ⁻¹ |
| 1 | right | <u>16</u> | 1 | > 330 | <u>39</u> | 7 | <u>34</u> | 5 | <u>192</u> | <u>33</u> | 2 |
| | left | <u>20</u> | 2 | > 330 | <u>64</u> | 8 | <u>36</u> | 7 | <u>216</u> | <u>15</u> | 2 |
| 2 | right | <u>32</u> | 6 | > 330 | <u>45</u> | 4 | <u>88</u> | 12 | <u>136</u> | 10 | 2 |
| | left | <u>84</u> | 12 | > 330 | <u>56</u> | 3 | <u>102</u> | 12 | <u>32</u> | <u>24</u> | 4 |
| 3 | right | <u>60</u> | 5 | > 330 | <u>45</u> | 8 | <u>48</u> | 5 | <u>318</u> | <u>33</u> | 2 |
| | left | <u>55</u> | 6 | > 330 | <u>54</u> | 3 | <u>37</u> | 3 | <u>230</u> | <u>27</u> | 2 |
| 4 | right | <u>41</u> | 4 | > 330 | <u>43</u> | 2 | <u>42</u> | 3 | <u>84</u> | 4 | 0 |
| | left | <u>53</u> | 9 | > 330 | <u>35</u> | 7 | <u>89</u> | 10 | <u>60</u> | 7 | 0 |
| 5 | right | <u>10</u> | 3 | > 330 | <u>75</u> | 5 | <u>44</u> | 8 | <u>166</u> | 13 | 0 |
| | left | <u>8</u> | 0 | > 330 | <u>77</u> | 4 | <u>34</u> | 4 | <u>94</u> | 7 | 0 |
| 6 | right | <u>59</u> | 9 | > 330 | <u>60</u> | 7 | <u>57</u> | 9 | <u>218</u> | <u>27</u> | 3 |
| | left | <u>95</u> | 12 | > 330 | <u>35</u> | 3 | <u>67</u> | 7 | <u>162</u> | 12 | 1 |
| 7 | right | <u>73</u> | 8 | > 330 | <u>147</u> | <u>28</u> | <u>56</u> | 6 | > 330 | <u>71</u> | 8 |
| | left | <u>69</u> | 10 | > 330 | <u>212</u> | <u>26</u> | <u>44</u> | 1 | > 330 | <u>62</u> | 4 |
| 8 | right | <u>73</u> | 10 | > 330 | <u>185</u> | <u>30</u> | <u>59</u> | 5 | > 330 | <u>57</u> | 8 |
| | left | <u>69</u> | 12 | > 330 | <u>161</u> | <u>32</u> | <u>67</u> | 7 | > 330 | <u>63</u> | 8 |
| 9 | right | <u>91</u> | 8 | > 330 | > 330 | <u>58</u> | <u>52</u> | 5 | > 330 | <u>70</u> | 6 |
| | left | <u>88</u> | 10 | > 330 | > 330 | <u>41</u> | <u>95</u> | 11 | <u>314</u> | <u>35</u> | 7 |
| 10 | right | <u>83</u> | 13 | > 330 | <u>60</u> | 7 | <u>137</u> | <u>19</u> | <u>70</u> | 7 | 0 |
| | left | <u>56</u> | 4 | > 330 | <u>62</u> | 7 | <u>99</u> | 11 | <u>66</u> | 5 | 1 |
| 11 | right | <u>113</u> | 7 | > 330 | <u>83</u> | 8 | <u>98</u> | 10 | > 330 | <u>64</u> | 10 |
| | left | <u>91</u> | 8 | > 330 | <u>81</u> | 7 | <u>98</u> | <u>15</u> | > 330 | <u>82</u> | 9 |
| 12 | right | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | left | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 13 | right | <u>121</u> | 13 | > 330 | <u>81</u> | 7 | <u>120</u> | 13 | > 330 | <u>86</u> | 11 |
| | left | <u>77</u> | 6 | > 330 | <u>70</u> | 8 | <u>95</u> | <u>14</u> | > 330 | <u>58</u> | 9 |
| 14 | right | <u>206</u> | <u>14</u> | > 330 | <u>71</u> | 7 | <u>151</u> | 7 | <u>166</u> | <u>14</u> | 2 |
| | left | <u>174</u> | <u>29</u> | > 330 | <u>77</u> | 12 | <u>148</u> | <u>20</u> | <u>132</u> | <u>18</u> | 0 |
| 15 | right | <u>48</u> | 4 | > 330 | <u>64</u> | 11 | <u>52</u> | 6 | > 330 | <u>42</u> | 5 |
| | left | <u>61</u> | 8 | > 330 | <u>74</u> | 7 | <u>99</u> | 11 | > 330 | <u>21</u> | 3 |

Table 3: Hygienic hand wash – test results (logarithms and reduction factors)
Test product: 2173

test product: **FORMULA 2173**
reference: soft soap

sample number: P 202323
order number: A 20-0305

| subject | hand | reference product | | | | | test product | | | | |
|---------------------|------|-------------------|------|---------------|------|-------------------|--------------|------|---------------|------|-------------------|
| | | prevalue log | | postvalue log | | reduction-factors | prevalue log | | postvalue log | | reduction-factors |
| | | R/L | mean | R/L | mean | | R/L | mean | R/L | mean | |
| 1 | R | 5.20 | 5.25 | 2.59 | 2.70 | 2.55 | 5.53 | 5.54 | 2.31 | 2.32 | 3.23 |
| | L | 5.30 | | 2.81 | | | 5.56 | | 2.32 | | |
| 2 | R | 5.51 | 5.71 | 2.65 | 2.70 | 3.01 | 5.94 | 5.98 | 2.13 | 1.92 | 4.06 |
| | L | 5.92 | | 2.75 | | | 6.01 | | 1.71 | | |
| 3 | R | 5.78 | 5.76 | 2.65 | 2.69 | 3.07 | 5.68 | 5.62 | 2.50 | 2.44 | 3.19 |
| | L | 5.74 | | 2.73 | | | 5.57 | | 2.37 | | |
| 4 | R | 5.61 | 5.67 | 2.63 | 2.59 | 3.08 | 5.62 | 5.79 | 1.92 | 1.85 | 3.94 |
| | L | 5.72 | | 2.54 | | | 5.95 | | 1.78 | | |
| 5 | R | 5.00 | 4.95 | 2.88 | 2.88 | 2.07 | 5.64 | 5.59 | 2.22 | 2.10 | 3.49 |
| | L | 4.90 | | 2.89 | | | 5.53 | | 1.97 | | |
| 6 | R | 5.77 | 5.87 | 2.78 | 2.66 | 3.21 | 5.76 | 5.79 | 2.35 | 2.28 | 3.51 |
| | L | 5.98 | | 2.54 | | | 5.83 | | 2.21 | | |
| 7 | R | 5.86 | 5.85 | 3.20 | 3.27 | 2.58 | 5.75 | 5.70 | 2.85 | 2.82 | 2.87 |
| | L | 5.84 | | 3.34 | | | 5.64 | | 2.79 | | |
| 8 | R | 5.86 | 5.85 | 3.29 | 3.27 | 2.58 | 5.77 | 5.80 | 2.76 | 2.78 | 3.02 |
| | L | 5.84 | | 3.24 | | | 5.83 | | 2.80 | | |
| 9 | R | 5.96 | 5.95 | 3.76 | 3.69 | 2.26 | 5.72 | 5.85 | 2.85 | 2.67 | 3.17 |
| | L | 5.94 | | 3.61 | | | 5.98 | | 2.50 | | |
| 10 | R | 5.92 | 5.83 | 2.78 | 2.79 | 3.05 | 6.15 | 6.07 | 1.85 | 1.83 | 4.24 |
| | L | 5.75 | | 2.79 | | | 6.00 | | 1.82 | | |
| 11 | R | 6.05 | 6.01 | 2.92 | 2.91 | 3.09 | 5.99 | 6.00 | 2.81 | 2.86 | 3.14 |
| | L | 5.96 | | 2.91 | | | 6.01 | | 2.91 | | |
| 12 | R | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | L | - | | - | | | - | | - | | |
| 13 | R | 6.08 | 5.98 | 2.91 | 2.88 | 3.11 | 6.08 | 6.04 | 2.93 | 2.85 | 3.19 |
| | L | 5.89 | | 2.85 | | | 6.00 | | 2.76 | | |
| 14 | R | 6.30 | 6.28 | 2.85 | 2.87 | 3.41 | 6.18 | 6.18 | 2.21 | 2.17 | 4.01 |
| | L | 6.27 | | 2.89 | | | 6.18 | | 2.13 | | |
| 15 | R | 5.68 | 5.73 | 2.81 | 2.84 | 2.90 | 5.72 | 5.86 | 2.62 | 2.47 | 3.38 |
| | L | 5.79 | | 2.87 | | | 6.00 | | 2.32 | | |
| arithm. mean | | 5.77 | | 2.91 | | 2.86 | 5.84 | | 2.38 | | 3.46 |
| absolute SD | | 0.33 | | 0.30 | | 0.38 | 0.19 | | 0.38 | | 0.43 |
| relative SD | | 5.65 | | 10.39 | | 13.47 | 3.29 | | 15.74 | | 12.48 |

SD standard deviation

R right

L left

Table 4: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks Test

Calculation using SPSS 13.0:

| Ranks | | | | Test Statistics ^b | | |
|-------|----------------|-----------------|-----------|------------------------------|------------------------|---------------------|
| | | N | Mean Rank | Sum of Ranks | R - P | |
| R - P | Negative Ranks | 14 ^a | 7,50 | 105,00 | Z | -3,296 ^a |
| | Positive Ranks | 0 ^b | ,00 | ,00 | Asymp. Sig. (2-tailed) | ,001 |
| | Ties | 0 ^c | | | Exact Sig. (2-tailed) | ,000 |
| | Total | 14 | | | Exact Sig. (1-tailed) | ,000 |
| | | | | | Point Probability | ,000 |

a. R < P
b. R > P
c. R = P

a. Based on positive ranks.
b. Wilcoxon Signed Ranks Test

For the calculated smaller sum of ranks (sum of positive ranks = **0.00**), the p-value was determined with **p = 0.000** (1-tailed). As this value does reach and fall below the required level of significance of $p = 0.01$, P is **significantly more** effective than R.

Calculation using the EN 1499 - Layout:

| Subject | log RF derived from | | Difference R - P | Rank of Difference | |
|--------------------------|---------------------|------|---------------------|--------------------|-----------|
| | R | P | | without sign | with sign |
| 1 | 2.55 | 3.23 | -0.68 | 9 | -9 |
| 2 | 3.01 | 4.06 | -1.05 | 12 | -12 |
| 3 | 3.07 | 3.19 | -0.12 | 3 | -3 |
| 4 | 3.08 | 3.94 | -0.86 | 10 | -10 |
| 5 | 2.07 | 3.49 | -1.42 | 14 | -14 |
| 6 | 3.21 | 3.51 | -0.30 | 5 | -5 |
| 7 | 2.58 | 2.87 | -0.29 | 4 | -4 |
| 8 | 2.58 | 3.02 | -0.44 | 6 | -6 |
| 9 | 2.26 | 3.17 | -0.91 | 11 | -11 |
| 10 | 3.05 | 4.24 | -1.19 | 13 | -13 |
| 11 | 3.09 | 3.14 | -0.05 | 1 | -1 |
| 12 | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |
| 13 | 3.11 | 3.19 | -0.08 | 2 | -2 |
| 14 | 3.41 | 4.01 | -0.60 | 8 | -8 |
| 15 | 2.90 | 3.38 | -0.48 | 7 | -7 |
| Sum of ranks [-]: | 105.00 | | | | |
| Sum of ranks [+]: | 0.00 | | | | |

The tabulated value for the smaller sum of ranks for $n = 14$ in the Wilcoxon test is **15** at a significance level of $p = 0.01$ in the directional test. As the calculated sum of ranks does reach and fall below this value (**sum of ranks** **[+] = 0.00**), P is **significantly more** effective than R.

Legend:

| | | |
|-----------|---|------------------|
| x | = | average value |
| \bar{x} | = | average value |
| RF | = | reduction factor |
| R | = | reduction factor |
| > 330 | = | not countable |
| n.d. | = | not determined |
| n.a. | = | not analysable |