VIS – Corporate Product Safety
Department of
Human Safety Assessment

D-40191 Düsseldorf

Managementsystem VIS

certified by DQS according to DIN EN ISO 9001 DIN EN ISO 14001 (Reg.-Nr. 81434)

# Incidin active
# Toxicological Hazard Assessment

**Summary**

Based on the toxicological potential and the mass content of the ingredients Incidin active has to be classified as „harmful" (Xn, R22-41) with respect to health effects.

***Zusammenfassung***

*Aufgrund der toxikologischen Eigenschaften und Massengehalte der Inhaltsstoffe ist Incidin active in Bezug auf seine gesundheitlichen Effekte als „gesundheitsschädlich" einzustufen (Xn, R22-41).*

## Application and chemical characterisation

Incidin active is a disinfecting agent which is used in an application concentration of up to 2 % for surface disinfection. The pH value of a 2 % solution is approx. 8. Incidin active is a powder basically containing sodium percarbonate, phosphonates and benzotriazole.

## Toxicological profile

In compliance with the respective EU regulations (1-2) the toxicological profile of the product can be deduced from the data of the ingredients (3-12).

The content of sodium percarbonate mainly determines the toxicological profile of Incidin active. Therefore Incidin active is classified in consideration of the conventional calculation method as "harmful" (Xn) and labelled with the risk phrases R22 "Harmful if swallowed" and R41 "Risk of serious damage to eyes".

The working solution containing up to 2 % Incidin active does not have to be labelled as harmful or irritating according to the Dangerous Preparations Directive (2).

Incidin active does not contain any ingredients classified as "mutagenic", "carcinogenic" or "toxic to reproduction".

Digitally signed by Bunic Gheorghe
Date: 2024.10.12 09:21:06 CEST
Reason: MoldSign Signature
Location: Moldova
MOLDOVA EUROPEANĂ

### Handling recommendations

After contact with eyes Incidin active may be seriously damaging. Therefore, appropriate protection measures are recommended when handling the product. Direct contact should be avoided by wearing protective gloves and goggles.

In case of eye contact, the eye should be immediately rinsed with copious amounts of water for at least 10 minutes. An oculist has to be consulted.

In case of skin contact, rinse with plenty of water. In case of discomfort, a physician should be consulted.

After accidental intake of the product the oral cavity should be rinsed out with plenty of water. Afterwards non-sparkling water (up to 2 glasses) should be given. A physician should be consulted.

Düsseldorf, 28 April 2009

Dr. Martina Hermann
Manager Human Safety Assessment

Christina Kaiser
Manager Human Safety Assessment

Literature:

1. Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances and current amendments
2. Council Directive 1999/45/EEC on the classification, packaging and labelling of dangerous preparations and current amendments
3. Henkel KGaA, HECLID Data Set RM 840093
4. Henkel KGaA, HECLID Data Set RM 113038
5. Henkel KGaA, HECLID Data Set RM 840129
6. Henkel KGaA, HECLID Data Set RM 840044
7. Henkel KGaA, HECLID Data Set RM 840104
8. Henkel KGaA, HECLID Data Set RM 840106
9. Henkel KGaA, HECLID Data Set RM 840134
10. Henkel KGaA, HECLID Data Set RM 840108
11. Henkel KGaA, HECLID Data Set RM 840118
12. Supplier MSDS RM 260302

# Henkel AG & Co. KGaA

**Microbiology**

# Test Report

17-12768-3

Virucidal activity

of

## Incidin Active

tested against

*Adenovirus*, type 5, Adenoid 75 strain

**According to EN 14476**

Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine – Test method and requirements (phase 2, step 1); EN 14476:2013+A1:2015/prA2:2016 (01/2017)

| | |
|---|---|
| Client: | Ecolab Deutschland GmbH |
| Author: | A. Kyas |
| Date: | 2017-08-24 |

The following report consists of 12 pages and may be reproduced only completely

H e n k e l AG & Co. KGaA
HSA Corporate Scientific Services
D-40191 Düsseldorf

Tel.: (0211) 797-4693
Fax: (0211) 798-2245

**Content**

Content ..... 2
1. Identity of the test institute ..... 2
2. Test substance ..... 2
3. Test method ..... 2
4. Experimental conditions ..... 2
5. Calculation of the virus titre ..... 6
6. Results ..... 7
7. Conclusion ..... 7
Table appendix .....
Tab. 1 Interference controls on host cells ..... 8
Tab. 2 Cytotoxicity controls on host cells ..... 8
Tab. 3 Formaldehyde control ..... 9
Tab. 4 DSA ..... 9
Tab. 5 Efficacy data / Titres / Reductionfactors ..... 10
Tab. 6 Calculated virus titre ..... 11
Tab. 8 Summery efficacy data ..... 12

## 1. Identity of the test institute

Henkel AG & Co. KGaA

HSA Corporate Scientific Services

D-40191 Düsseldorf

## 2. Test substance(s)

| | | |
|---|---|---|
| 2.1. | Product names | **Incidin Active** |
| 2.1.1 | Batch | 1386FM0107 |
| 2.1.2 | Formula No. | unknown |
| 2.1.3 | Laboratory No. | unknown |
| 2.1.4 | Manufacturing date | unknown |
| 2.1.5 | Expiry date | 09/2018 |
| 2.1.6 | Manufacturer | Ecolab Deutschland GmbH, Monheim |
| 2.1.7 | Date of sample entry | 2017-07-27 |
| 2.1.8 | Storage conditions in the laboratory | room temperature |
| 2.19 | Appearance | white and yellow granules |
| 2.1.10 | Active substance | PAA |

## 3. Test method

3.1 DIN EN 14476: Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine – Test method and requirements (phase 2, step 1) version EN 14476:2013+A1:2015/prA2:2016 (01/2017)

## 4. Experimental conditions

4.1 Test period

August 2017

4.2 Test concentration(s) / contact times

| | |
|---|---|
| 2.0% | 10 minutes |
| 1.0% | 10 minutes |
| 0.5% | 10 minutes |
| 1.0% | 60 minutes |
| 0.5% | 60 minutes |
| 0.1% | 60 minutes |

The application concentrations and contact times were given by client.

4.3 Test structure

800µl Test product (x1.25)
+ 100µl dirty load
+ 100µl virus inoculum preparation

All assay ingredients were allowed to adjust to test temperature. The assays were performed in a temperature-controlled water bath.

4.4 Interfering substance(s)

Dirty conditions: final concentration: 3.0g/L BSA + 3.0g/L Erythrocytes

4.5 Appearance of the product dilution(s)

| | |
|---|---|
| 2.0% x 1.25 | clear, colorless, liquid, no precipitation |
| 1.0% x 1.25 | clear, colorless, liquid, no precipitation |
| 0.5% x 1.25 | clear, colorless, liquid, no precipitation |
| 0.1% x 1.25 | clear, colorless, liquid, no precipitation |

Assay(s) with dirty load and virus-suspension:

| | |
|---|---|
| 2.0% | clear, colorless, liquid, no precipitation |
| 1.0% | clear, light reddish, liquid, no precipitation |
| 0.5% | clear, light reddish, liquid, no precipitation |
| 0.1% | clear, reddish, liquid, no precipitation |

4.6 Test organisms / Host cells

*Adenovirus*, type 5, Adenoid 75 strain (ATCC-VR 5) obtained from ATCC 2003
Passage 2 from 2010-09-11
HELA-S3 cells, DSMZ 2005, Passage 57 / 2017-08-15

4.7 Test temperature

20.0°C ± 1°C (water bath)

4.8 Procedure prior the test

All assay ingredients were allowed to adjust to test temperature. The assay was performed in a temperature-controlled water bath.
For the titer determination of the virus inoculum preparation blanks were done with **WSH** instead of test product.
After the contact time the reaction is annulled by transfer of 100µl aliquots to 900µl ice-cold supplemented DMEM + 2% FCS and serial 1:10-dilutions up to $10^{-9}$. As annulment verification this is already controlled at time 0. The recovery of residual active virus was performed in quantal tests on the corresponding host cells in microtitre plates using 8 parallels by transferring 100µl aliquots of each dilution to confluent monolayer cells.

After adequate incubation the cultures are read out for cytopathic effects (CPEs) with an inverse microscope. The effects are evaluated as follows:

0 = no cell damage = no virus activity
1 = <25% cell damage = virus activity
2 = ≈50% cell damage = virus activity
3 = ≈75% cell damage = virus activity
4 = ≈100% cell damage = virus activity

4.9 Neutralisation

Instantaneous dilutions of the test assays in ice-cold DMEM+2%FCS (1:10, 1:100 ...)

4.10 Reagents

| Reagent | Supplier | Batch / LOT | Best before |
|---|---|---|---|
| Bovine serum albumin (BSA) | Serva | 170146 | 10/2020 |
| Sheep Erythrocytes | Fiebig | 31231_100/01 | 2017-08-21 |
| DMEM FG0415 | Biochrom | 0730E | 07/2018 |
| Fetal calf serum (FCS) S0115 | Gibco | 0522D | 05/2021 |
| Formaldehyde (reference) | Applichem | 6M014885 | 09/2019 |
| 10xPBS | Gibco | 1775328 | 03/2018 |
| Trypsine/EDTA | Biochrom | 1002E | 09/2019 |
| Distilled water | HSA Microbiology | 2017062206-1 | 11/2017 |
| WSH (Hard water) | HSA Microbiology | 2017081601-1 | pH: 6.95, Fresh usage |
| D-PBS | Lonza | 6MB179 | 09/2018 |

4.11 Validation tes(t)s

All assays for cytotoxicity, interference, formaldehyde assay (reference), disinfection suppression were run at room temperature.

4.12 Cytotoxicity control(s)

Products: 800µl Test product (x1.25) + 100µl dirty load + 100µl WSH

Formaldehyde: 500µl HCHO (1.4%) + 500µl WSH

After mixing and direct serial 1:10-dilutions in ice-cold supplemented DMEM + 2% FCS monolayered host cells in microtitre plates are inoculated by 100µl aliquots in 8 parallels. After adequate incubation the cultures are read out for cytotoxic effects (CTEs) with an inverse microscope. The effects observed should be distinguished morphologically from CPEs and are evaluated as follows: 0 = no CTE; X = CTE.
If CTEs cannot be distinguished from CPEs, their degree may not exceed cytopathic cell damage in order to attribute the effect clearly to the virucidal properties of the test product.

4.13 Interference control(s)

100µl of the lowest non-cytotoxic dilution of the test product (here we report 1:1000) and 100µl PBS (control) respectively were transferred to 8 parallels monolayered host cells in microtiter plates. After 1h contact time at 36°C the supernatant is discarded and replaced by 100µl DMEM + 2% FCS -diluted virus inoculum preparation in dilution steps $10^{-2}$– $10^{-9}$.

After adequate incubation the cultures are read out for cytopathic effects (CPEs) with an inverse microscope. Only those dilutions may be used for RF-calculations, where the virus titers in the PBS-treated cells and in the product-treated cells may not differ <1lg.

4.14 Disinfection suppression assay

100µl Load
+100µl DMEM+2%FCS
+800µl Product (x1.25)
From each of the test assay an 100µl aliquot is withdrawn already at time 0±5sec. and immediately transferred to 800µl ice-cold supplemented DMEM +2% FCS adding on 100µl Virus suspension for 30 minutes. The virus titers may differ from the PBS control titer by ≤0.5lg.

4.15 Performance controls with formaldehyde

100µl virus inoculum preparation
+400µl PBS
*+500µl 1.4% solution* of formol (= 37% formaldehyde)
The actual concentration of this solution was analysed as 1.5% (w/v) formaldehyde

After contact times of 30 and 60 minutes 100µl aliquots are withdrawn and transferred to ice-cold supplemented DMEM + 2% FCS and serial 1:10 dilutions are prepared. 100µl aliquots of each dilution are plated on monolayered host cells in microtitre plates and after adequate incubation the cultures are read out for cytopathic effects (CPEs) with an inverse microscope.

## 5. Calculation of the virus titre

From the qualitative results of the residual infectivity the titre m of the infective virus particles in the original 1000µl aliquots may be re-calculated as 50% infective dose ($TCID_{50}$) by the method of *Spearman & Kärber*

$$\mathbf{m}\ (TCID_{50}) = \mathbf{X_k} + \mathbf{d/2} - \mathbf{d^*\Sigma p_i}$$

| | | |
|---|---|---|
| **m** | = | negative decadal logarithm $TCID_{50}$ in the first 1000µl aliquot |
| $\mathbf{X_k}$ | = | decadal logarithm of the first dilution where all parallels (here 8) are positive |
| **D** | = | decadal logarithm of the dilution factor (here 1) |
| $\mathbf{P_i}$ | = | ratio of positives in one series: |

| Positives | $P_i$ |
|---|---|
| 0/8 | 0.000 |
| 1/8 | 0.125 |
| 2/8 | 0.250 |
| 3/8 | 0.375 |
| 4/8 | 0.500 |
| 5/8 | 0.625 |
| 6/8 | 0.750 |
| 7/8 | 0.875 |
| 8/8 | 1.000 |

The standard deviation $\mathbf{S_m}$ is calculated according to the following formula

$$\mathbf{S_m} = \sqrt{\mathbf{d^2}\sum\left[\mathbf{P_i}\times\left(\mathbf{1}-\mathbf{P_i}\right)\div\left(\mathbf{n}-\mathbf{1}\right)\right]}$$

| | | |
|---|---|---|
| $\mathbf{S_m}$ | = | standard deviation of the logarithmic titre |
| **d** | = | decadal logarithm of the dilution factor (here 1) |
| $\mathbf{P_i}$ | = | ratio of positives in the parallels |

In many cases it is observed that $P_i = 1$ and $P_{i+2} = 0$. In case of a dilution series with a dilution factor of 10 and 8 parallels the above mentioned formula may then be simplified to

$$\mathbf{S_m} = \sqrt{\left[\mathbf{P_{i+1}}\times\left(\mathbf{1}-\mathbf{P_{i+1}}\right)\div\mathbf{7}\right]}$$

**Calculation of the virucidal effect (logarithmic reduction factor of the infectivity)**

The virucidal effect of the tested product is calculated as logarithmic reduction factor **RF** = difference between the logarithmic virus control titres minus the residual logarithmic virus titres found for the product containing assays.

$$\mathbf{RF = log}\ (\text{Virus control CPE}) - \mathbf{log}\ (\text{Test product CPE})$$

in cases where the cytotoxic effects (CTE) exceed the cytopathic effects (CPE) the calculated reduction factors are indicated as "≥".The confidence intervals $\mathbf{K_{RF}}$ of the reduction factors are calculated following the formula:

$$\mathbf{K_{RF}} = \sqrt{(2\mathbf{S_{m(control)}})^2 + (2\mathbf{S_{m(residualtiter)}})^2}$$

## 6. Results

| Incidin Active | | | |
|---|---|---|---|
| Parameter(s) | | logarithmic reduction factor(s) incl. 95% confidence interval(s) against *Adenovirus*, type 5, Adenoid 75 strain | |
| Application conc. | contact time | clean conditions | dirty conditions |
| 2.0% | 0 min | Not done | 4.88±0.25 |
| 1.0% | 0 min | Not done | 4.88±0.25 |
| 0.5% | 0 min | Not done | 0.00±0.35 |
| 0.1% | 0 min | Not done | -0.13±0.25 |
| | | | |
| 2.0% | 10 min | Not done | ≥4.88±0.25 |
| 1.0% | 10 min | Not done | ≥4.88±0.25 |
| 0.5% | 10 min | Not done | ≥4.88±0.25 |
| | | | |
| 1.0% | 60 min | Not done | ≥5.00±0.00 |
| 0.5% | 60 min | Not done | ≥5.00±0.00 |
| 0.1% | 60 min | Not done | 3.13±0.25 |

## 7. Conclusion

Incidin Active was tested for virucidal efficiency acc. to EN 14476:2013+A1:2015/prA2:2016 (01/2017) in a suspension test against surrogate viruses.

For a sufficient efficacy, this norm requires a reduction of virus titre of ≥4.0lg. Here we report the results against the non-enveloped *Adenovirus*, type 5, Adenoid 75 strain.

The product met the requirements with a concentration of:

**0.5% /1.0% and 2% within 10 minutes at 20°C under dirty conditions and**

**0.5% and 1.0% within 60 minutes at 20°C under dirty conditions**

based on the results of the EN 14476-test method.

Düsseldorf, 2017-08-24

Dr. Roland Breves
Head of Microbiology

Andrea Kyas
Laboratory

## Table appendix

### Interference controls on Hela cells

m = Titer as $log_{10}$-$TCID_{50}$/ml acc. *Spearman & Kärber*; $P_i$ = Ratio of positives in a series of parallels

| assay | product | load | Product dilution | log dilution | | | | | | | | m incl. 95% confidence interval |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | |
| Interference-control(s) | PBS | w/o | - | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444400 Pi = 0.750 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 6.25±0.33 |
| | Incidin Active | w/o | 1:1000 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 6.50±0.00 |

### Tab. 2 Cytotoxicity controls (x) on Hela cells

| assay | load | Host cell(s) | log dilution | | | | | | | | Cell control | m |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | | |
| Incidin Active 2.0% | dirty | TIB | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 1.5±0.0 |
| Incidin Active 1.0% | dirty | | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 1.5±0.0 |
| Incidin Active 0.5% | dirty | | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 1.5±0.0 |
| Incidin Active 0.1% | dirty | | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | <0.5±0.0 |
| DMEM+5%FCS | dirty | | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | <0.5±0.0 |
| WSH | dirty | | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | <0.5±0.0 |
| Formaldehyde 0.75% | without | | xxxxxxxx | xxxxxxxx | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 3.5±0.0 |

## Tab. 3 Formaldehyde control against *Adenovirus*, type 5, Adenoid 75 strain.

| Assay HCHO | t (min.) | log dilution | | | | | | | | Cell-control | m incl. 95% ci | log RF incl. 96%ci |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | | | |
| | 30 | Not done | xxxxxxxx | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 3.50±0.00 | ≥3.00±0.00 |
| | 60 | Not done | xxxxxxxx | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 3.50±0.00 | ≥3.00±0.00 |
| WSH control | t (min.) | log dilution | | | | | | | | Cell-control | m | |
| | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | | | |
| | 60 | Not done | 44444444 | 44444444 | 44444444 | 44444444 | 44444444 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 6.50±0.00 | |

The formaldehyde concentration was analytically determined as 1.5% resulting to an assay concentration of 0.75%.

## Tab 4. Disinfection suppression assay(s)

| Disinfection suppression assay(s) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Product | Application conc (%) | Load | Time | titre | Sufficient according to EN14476 |
| PBS | - | Dirty | 30 min. | 6.50±0.00 | |
| Incidin Active | 2.0 | Dirty | 30 min. | 6.25±0.33 | Yes |
| Incidin Active | 1.0 | Dirty | 30 min. | 6.38±0.25 | Yes |
| Incidin Active | 0.5 | Dirty | 30 min. | 6.38±0.25 | Yes |
| Incidin Active | 0.1 | Dirty | 30 min. | 6.38±0.25 | Yes |

## Tab. 5 Efficacy data of Incidin Active against *Adenovirus*, type 5, Adenoid 75 strain.

| product | ac % | load | Temp (°C) | Time (min) | log dilution (s) | | | | | | | | Result(s) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | Titre | sm |
| Incidin Active | 2.0 | dirty | 20 | 0 | xxxxxxxx Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 1.50±0.00 | 0.000 |
| Incidin Active | 1.0 | dirty | 20 | 0 | xxxxxxxx Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 1.50±0.00 | 0.000 |
| Incidin Active | 0.5 | dirty | 20 | 0 | xxxxxxxx Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444440 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0.875 | 00000000 Pi = 0 | 6.38±0.25 | 0.125 |
| Incidin Active | 0.1 | dirty | 20 | 0 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 6.50±0.00 | 0.000 |
| WSH | - | dirty | 20 | 0 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444440 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0.875 | 00000000 Pi = 0 | 6.38±0.25 | 0.125 |

| product | ac % | load | Temp (°C) | Time (min) | log dilution (s) | | | | | | | | Result(s) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | Titre | sm |
| Incidin Active | 2.0 | dirty | 20 | 10 | xxxxxxxx Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 1.50±0.00 | 0.000 |
| Incidin Active | 1.0 | dirty | 20 | 10 | xxxxxxxx Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 1.50±0.00 | 0.000 |
| Incidin Active | 0.5 | dirty | 20 | 10 | xxxxxxxx Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 1.50±0.00 | 0.000 |
| WSH | - | dirty | 20 | 10 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444440 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0.875 | 00000000 Pi = 0 | 6.38±0.25 | 0.125 |

| product | ac % | load | Temp (°C) | Time (min) | log dilution (s) | | | | | | | | Result(s) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | Titre | sm |
| Incidin Active | 1.0 | dirty | 20 | 60 | xxxxxxxx Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 1.50±0.00 | 0.000 |
| Incidin Active | 0.5 | dirty | 20 | 60 | xxxxxxxx Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 1.50±0.00 | 0.000 |
| Incidin Active | 0.1 | dirty | 20 | 60 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444440 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 3.38±0.25 | 0.125 |
| WSH | - | dirty | 20 | 60 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 6.50±0.00 | 0.000 |

**Tab. 6 Calculated virus titres and logarithmic reduction factors incl. 95% confidence intervals**

| Product | Application concentration (%) | load | Cytotoxicity (log steps) | log-TCID $_{50}$ after ... | | | | | >4 $log_{10}$ decrease of virus particles after... |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 0 | 10 min | 30 min | 60 min | 120 min | |
| Incidin Active | 2.0 | dirty conditions | 1.5 | 1.50±0.00 | 1.50±0.00 | | | | sufficient within 10 min |
| | | | | RF 4.88±0.25 | RF ≥4.88±0.25 | | | | |
| | 1.0 | dirty conditions | 1.5 | 1.50±0.00 | 1.50±0.00 | | 1.50±0.00 | | sufficient within 10 min |
| | | | | RF 4.88±0.25 | RF ≥4.88±0.25 | | RF ≥5.00±0.00 | | |
| | 0.5 | dirty conditions | 1.5 | 6.38±0.25 | 1.50±0.00 | | 1.50±0.00 | | sufficient within 10 min |
| | | | | RF 0.00±0.35 | RF ≥4.88±0.25 | | RF ≥5.00±0.00 | | |
| | 0.1 | dirty conditions | <0.5 | 6.50±0.00 | | | 3.38±0.25 | | Not sufficient within 60 min |
| | | | | RF -0.13±0.25 | | | RF 3.13±0.25 | | |
| WSH | - | dirty conditions | <0.5 | 6.38±0.25 | 6.38±0.25 | | 6.50±0.00 | | |
| WSH control for formaldehyde | - | - | <0.5 | | | | 6.50±0.00 | | |
| Formaldehyde | 0.75 | - | 3.5 | | | 3.50±0.00 | 3.50±0.00 | | Sufficient acc. EN14476 |
| | | | | | | RF ≥3.00±0.00 | RF ≥3.00±0.00 | | |

**Tab. 7.0 Summary Efficacy data for Incidin Active against *Adenovirus*, type 5, Adenoid 75 strain.**

| Product | Ac (%) | load | Log $_{10}$ $TCID_{50}$/ml incl. 95% Confidence interval(s) after | | | | | | RF incl. 95% Confidence interval(s) after | | | | | | ≥4 $log_{10}$ Reduction after...min |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 min | 5 min | 10 min | 30min | 60 min | 120 min | 0 min | 5 min | 10 min | 30min | 60 min | 120 min | |
| Incidin Active | 2.0 | dirty | 1.50±0.00 | | 1.50±0.00 | | | | RF 4.88±0.25 | | RF ≥4.88±0.25 | | | | Sufficient within 10 min |
| | 1.0 | dirty | 1.50±0.00 | | 1.50±0.00 | | 1.50±0.00 | | RF 4.88±0.25 | | RF ≥4.88±0.25 | | RF ≥5.00±0.00 | | Sufficient within 10 min |
| | 0.5 | dirty | 6.38±0.25 | | 1.50±0.00 | | 1.50±0.00 | | RF 2.38±0.37 | | RF ≥4.88±0.25 | | RF ≥5.00±0.00 | | Sufficient within 10 min |
| | 0.1 | dirty | 6.50±0.00 | | | | 3.38±0.25 | | RF 0.38±0.37 | | | | RF 3.13±0.25 | | Not Sufficient within 60 min |
| WSH | - | dirty | 6.38±0.25 | | 6.38±0.25 | | 6.50±0.00 | | | | | | | | |
| IF PBS | - | - | | | | | 6.25±0.33 | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| IF Product | 0.002 | - | | | | | 6.50±0.00 | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| DSA PBS | - | dirty | | | | 6.50±0.00 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| DSA control product | 2.0 | dirty | | | | 6.25±0.33 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| | 1.0 | dirty | | | | 6.38±0.25 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| | 0.5 | dirty | | | | 6.38±0.25 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| | 0.1 | dirty | | | | 6.38±0.25 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| WSH control | - | - | | | | | 6.50±0.00 | | | | | | | | |
| Formaldehyde | 0.75 | - | | | | 3.50±0.00 | 3.50±0.00 | | | | | RF ≥3.00±0.00 | RF ≥3.00±0.00 | | Sufficient acc. EN14476 |

IF = Interference control, DSA = disinfection suppressions assay

Henkel AG & Co. KGaA

Microbiology

# Test Report

17-12768-6

Virucidal activity

of

**Incidin Active**
tested against

*Poliovirus*, type 1, LSc-2ab *strain*

**According to EN 14476**
Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
EN 14476:2013+A1:2015/prA2:2016 (01/2017)

| | |
|---|---|
| Client: | Ecolab Deutschland GmbH |
| Author: | A. Kyas / U. Bäumer |
| Date: | 2017-10-27 |

The following report consists of 9 pages and may be reproduced only completely

H e n k e l AG & Co. KGaA
HSA Corporate Scientific Services
D-40191 Düsseldorf

Tel.: (0211) 797-4693
Fax: (0211) 798-2245

## Content

Content ..... 2
1. Identity of the test institute ..... 2
2. Test substance ..... 2
3. Test method ..... 2
4. Experimental conditions ..... 2
5. Calculation of the virus titre ..... 5
6. Results ..... 6
7. Conclusion ..... 6
Table appendix .....
Tab. 1 Interference controls on host cells ..... 7
Tab. 2 Cytotoxicity controls on host cells ..... 7
Tab. 3 Formaldehyde control ..... 7
Tab. 4 Disinfection Suppressions Assay (DSA) ..... 8
Tab. 5 Efficacy data / Titres / Reductionfactors ..... 8
Tab. 6 Calculated virus titre ..... 9
Tab. 7 Summery efficacy data ..... 9

## 1. Identity of the test institute

Henkel AG & Co. KGaA
HSA Corporate Scientific Services
D-40191 Düsseldorf

## 2. Test substance(s)

| | | |
|---|---|---|
| 2.1. | Product names | **Incidin Active** |
| 2.1.1 | Batch | 1386FM0107 |
| 2.1.2 | Formula No. | unknown |
| 2.1.3 | Laboratory No. | unknown |
| 2.1.4 | Manufacturing date | unknown |
| 2.1.5 | Expiry date | 09/2018 |
| 2.1.6 | Manufacturer | Ecolab Deutschland GmbH, Monheim |
| 2.1.7 | Date of sample entry | 2017-07-27 |
| 2.1.8 | Storage conditions in the laboratory | room temperature |
| 2.19 | Appearance | white and yellow granules |
| 2.1.10 | Active substance | PAA |

## 3. Test method

3.1 DIN EN 14476: Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine – Test method and requirements (phase 2, step 1) version EN 14476:2013+A1:2015/prA2:2016 (01/2017)

## 4. Experimental conditions

4.1 Test period
October 2017

4.2 Test concentration(s) / contact times

2.0% 10 and 15 minutes

Preparation of test solution: 1000ml (weight of sample taken: 20x1.25=25g product)

The application concentration and contact times were given by client.

4.3 Test structure

800µl Test product (x1.25)
+ 100µl dirty load
+ 100µl virus inoculum preparation

All assay ingredients were allowed to adjust to test temperature. The assays were performed in a temperature-controlled water bath.

4.4 Interfering substance(s)

Dirty conditions: final concentration: 3.0g/L BSA + 3.0g/L Erythrocytes

4.5 Appearance of the product dilution(s)

2.0% x 1.25 light turbid, light yellow, liquid, precipitate

Assay(s) with dirty load and virus-suspension:

2.0% clear, colorless, liquid, no precipitate

All assay ingredients were allowed to adjust to test temperature. The assays were performed in a temperature-controlled water bath.

4.6 Test organisms / Host cells

*Poliovirus,* type 1, LSc-2ab strain- obtained from EUROVIR,
Passage 2 from 2016-07-24
RD (Rhabdomyosarcoma cells) – obtained from Steinmann
Passage 79 from 2017-10-11

4.7 Test temperature

20.0°C ± 1°C (water bath)

4.8 Procedure prior the test

All assay ingredients were allowed to adjust to test temperature. The assay was performed in a temperature-controlled water bath. For the titer determination of the virus inoculum preparation blanks were done with **WSH** instead of test product. After the contact time the reaction is annulled by transfer of 100µl aliquots to 900µl ice-cold supplemented DMEM + 2% FCS and serial 1:10-dilutions up to $10^{-9}$. As annulment verification this is already controlled at time 0. The recovery of residual active virus was performed in quantal tests on the corresponding host cells in microtitre plates using 8 parallels by transferring 100µl aliquots of each dilution to confluent monolayer cells.
After adequate incubation the cultures are read out for cytopathic effects (CPEs) with an inverse microscope. The effects are evaluated as follows:

0 = no cell damage = no virus activity
1 = <25% cell damage = virus activity
2 = ≈50% cell damage = virus activity
3 = ≈75% cell damage = virus activity
4 = ≈100% cell damage = virus activity

4.9 Neutralisation

Instantaneous dilutions of the test assays in ice-cold DMEM+2%FCS (1:10, 1:100 ...)

4.10 Reagents

| Reagent | Supplier | Batch / LOT | Best before |
|---|---|---|---|
| Bovine serum albumin (BSA) | Serva | 170146 | 10/2020 |
| Sheep Erythrocytes | Self preperation | 2017-10-11 | Fresh usage |
| Defib. Sheep Blood | Thermo | 33304500 | 10/2017 |
| DMEM FG0415 | Biochrom | 0730E | 07/2018 |
| Fetal calf serum (FCS) S0115 | Gibco | 0522D | 05/2021 |
| Formaldehyde (reference) | Applichem | 6M014885 | 09/2019 |
| 10xPBS | Gibco | 1775328 | 03/2018 |
| Trypsine/EDTA | Biochrom | 1002E | 09/2019 |
| Distilled water | HSA Microbiology | 2017062206-1 | 11/2017 |
| WSH (Hard water) | HSA Microbiology | 2017101202-1 | pH: 6.98, Fresh usage |
| D-PBS | Lonza | 6MB179 | 09/2018 |

4.11 Validation test(s)

All assays for cytotoxicity, interference, formaldehyde (reference), disinfection suppression were run at room temperature.

4.12 Cytotoxicity control(s)

Product: 800µl Test product (x1.25) + 100µl dirty load + 100µl WSH

Formaldehyde: 500µl HCHO (1.4%) + 500µl WSH

After mixing and direct serial 1:10-dilutions in ice-cold supplemented DMEM + 2% FCS monolayered host cells in microtitre plates are inoculated by 100µl aliquots in 8 parallels. After adequate incubation the cultures are read out for cytotoxic effects (CTEs) with an inverse microscope. The effects observed should be distinguished morphologically from CPEs and are evaluated as follows: 0 = no CTE; X = CTE.

If CTEs cannot be distinguished from CPEs, their degree may not exceed cytopathic cell damage in order to attribute the effect clearly to the virucidal properties of the test product.

4.13 Interference control(s)

100µl of the lowest non-cytotoxic dilution of the test product (here we report 1:1000) and 100µl PBS (control) respectively were transferred to 8 parallels monolayered host cells in microtiter plates. After 1h contact time at 36°C the supernatant is discarded and replaced by 100µl DMEM + 2% FCS -diluted virus inoculum preparation in dilution steps $10^{-2}$– $10^{-9}$.

After adequate incubation the cultures are read out for cytopathic effects (CPEs) with an inverse microscope. Only those dilutions may be used for RF-calculations, where the virus titers in the PBS-treated cells and in the product-treated cells may not differ <1lg.

4.14 Disinfection suppression assay

100µl Load
+100µl DMEM+2%FCS
+800µl Product (x1.25)

From each of the test assay an 100µl aliquot is withdrawn already at time 0±5sec. and immediately transferred to 800µl ice-cold supplemented DMEM +2% FCS adding on 100µl Virus suspension for 30 minutes. The virus titers may differ from the PBS control titer by ≤0.5lg.

4.15 Performance controls with formaldehyde

100µl virus inoculum preparation
+400µl PBS
*+500µl 1.4% solution* of formol (= 37% formaldehyde)
The actual concentration of this solution was analysed as 1.4% (w/v) formaldehyde
After contact times of 30, 60 and 120 minutes 100µl aliquots are withdrawn and transferred to ice-cold supplemented DMEM +2% FCS and serial 1:10 dilutions are prepared. 100µl aliquots of each dilution are plated on monolayered host cells in microtitre plates and after adequate incubation the cultures are read out for cytopathic effects (CPEs) with an inverse microscope.

## 5.1 Calculation of the virus titre

From the qualitative results of the residual infectivity the titre m of the infective virus particles in the original 1000µl aliquots may be re-calculated as 50% infective dose ($TCID_{50}$) by the method of *Spearman & Kärber*

$$\mathbf{m}\ (TCID_{50}) = \mathbf{X_k + d/2 - d^*\Sigma p_i}$$

| | | |
|---|---|---|
| **m** | = | negative decadal logarithm $TCID_{50}$ in the first 1000µl aliquot |
| $\mathbf{X_k}$ | = | decadal logarithm of the first dilution where all parallels (here 8) are positive |
| **D** | = | decadal logarithm of the dilution factor (here 1) |
| $\mathbf{P_i}$ | = | ratio of positives in one series: |

| Positives | $P_i$ |
|---|---|
| 0/8 | 0.000 |
| 1/8 | 0.125 |
| 2/8 | 0.250 |
| 3/8 | 0.375 |
| 4/8 | 0.500 |
| 5/8 | 0.625 |
| 6/8 | 0.750 |
| 7/8 | 0.875 |
| 8/8 | 1.000 |

The standard deviation $\mathbf{S_m}$ is calculated according to the following formula

$$\mathbf{S_m} = \sqrt{\mathbf{d^2 \sum [P_i \times (1 - P_i) \div (n - 1)]}}$$

| | | |
|---|---|---|
| $\mathbf{S_m}$ | = | standard deviation of the logarithmic titre |
| **d** | = | decadal logarithm of the dilution factor (here 1) |
| $\mathbf{P_i}$ | = | ratio of positives in the parallels |

In many cases it is observed that $P_i = 1$ and $P_{i+2} = 0$. In case of a dilution series with a dilution factor of 10 and 8 parallels the above mentioned formula may then be simplified to

$$\mathbf{S_m} = \sqrt{\mathbf{[P_{i+1} \times (1 - P_{i+1}) \div 7]}}$$

**Calculation of the virucidal effect (logarithmic reduction factor of the infectivity)**

The virucidal effect of the tested product is calculated as logarithmic reduction factor **RF** = difference between the logarithmic virus control titres minus the residual logarithmic virus titres found for the product containing assays.

$$\mathbf{RF = log}\ (\text{Virus control CPE}) \mathbf{-\ log}\ (\text{Test product CPE})$$

in cases where the cytotoxic effects (CTE) exceed the cytopathic effects (CPE) the calculated reduction factors are indicated as "≥".The confidence intervals $\mathbf{K_{RF}}$ of the reduction factors are calculated following the formula:

$$\mathbf{K_{RF}} = \sqrt{(2\mathbf{S_{m(control)}})^2 + (2\mathbf{S_{m(residualtiter)}})^2}$$

## 6. Results

| Incidin Active | | | |
|---|---|---|---|
| **Parameter(s)** | | **logarithmic reduction factor(s) incl. 95% confidence interval(s) against *Poliovirus,* type 1, LSc-2ab strain** | |
| **Application conc.** | **contact time** | **clean conditions** | **dirty conditions** |
| 2.0% | 0 min | Not done | 0.75±0.33 |
| | 10 min | Not done | 4.00±0.35 |
| | 15 min | Not done | 5.50±0.44 |

## 7. Conclusion

Incidin Active was tested for virucidal efficiency acc. to EN 14476:2013+A1:2015/prA2:2016 (01/2017) in a suspension test against surrogate viruses.

For a sufficient efficacy, this norm requires a reduction of virus titre of ≥4.0lg. Here we report the results against the non-enveloped *Poliovirus,* type 1, LSc-2ab strain.

The product met the requirements with a concentration of **2.0% within 10 minutes at 20°C under dirty conditions** based on the results of the EN 14476-test method.

Düsseldorf, 2017-10-27

Ulrich Bäumer
Head of Laboratory

Andrea Kyas
Laboratory

## Table appendix

### Interference controls on RD cells

m = Titer as $log_{10}$-$TCID_{50}$/ml acc. *Spearman* & *Kärber*; $P_i$ = Ratio of positives in a series of parallels

| assay | product | load | Product dilution | log dilution | | | | | | | | m incl. 95% confidence interval |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | |
| Interference-control(s) | PBS | w/o | - | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444400 Pi = 0.250 | 00000000 Pi = 0 | 7.25±0.33 |
| | Incidin Active | w/o | 0.002% | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444400 Pi = 0.250 | 00000000 Pi = 0 | 7.25±0.33 |

### Tab. 2 Cytotoxicity controls (x) on RD cells

| assay | load | Host cell(s) | log dilution | | | | | | | | Cell control | m |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | | |
| Incidin Active 2.0% | dirty | RD | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 1.50±0.00 |
| DMEM+5%FCS | dirty | | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | <0.50±0.00 |
| WSH | dirty | | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | <0.50±0.00 |
| Formaldehyde 0.75% | without | | xxxxxxxx | xxxxxxxx | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 3.50±0.00 |

### Tab. 3 Formaldehyde control against *Poliovirus,* type 1, LSc-2ab strain

| assay | t (min.) | log dilution | | | | | | | | Cell-control | m incl. 95% ci | log RF incl. 96%ci |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | | | |
| HCHO 0.7% | 30 | Not done | xxxxxxxx | xxxxxxxx | 44444444 | 44444444 | 44440000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 6.00±0.38 | 1.25±0.50 |
| HCHO 0.7% | 60 | Not done | xxxxxxxx | xxxxxxxx | 44444444 | 44440000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 5.00±0.38 | 2.25±0.50 |
| HCHO 0.7% | 120 | Not done | xxxxxxxx | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 3.50±0.00 | ≥3.75±0.33 |
| WSH | 120 | Not done | 44444444 | 44444444 | 44444444 | 44444444 | 44444444 | 44444400 | 00000000 | 00000000 | 7.25±0.33 | |

The formaldehyde concentration was analytically determined as 1.5% resulting to an assay concentration of 0.70%.

## Tab 4. Disinfection suppression assay(s)

| Disinfection suppression assay(s) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Product** | **Application conc (%)** | **Load** | **Time** | **titre** | **Sufficient according to EN14476** |
| PBS | - | Dirty | 30 min | 7.38±0.25 | |
| Incidin Active | 2.0 | Dirty | 30 min | 7.25±0.33 | Yes |

## Tab. 5 Efficacy data of Incidin Active against *Poliovirus*, type 1, LSc-2ab strain

| product | ac % | load | Temp (°C) | Time (min) | log dilution (s) | | | | | | | | Result(s) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | Titre | sm |
| Incidin Active | 2.0 | dirty | 20 | 0 | xxxxxxxx Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 6.50±0.00 | 0.000 |
| WSH | - | dirty | 20 | 0 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444400 Pi = 0.750 | 00000000 Pi = 0 | 7.25±0.33 | 0.164 |

| product | ac % | load | Temp (°C) | Time (min) | log dilution (s) | | | | | | | | Result(s) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | Titre | sm |
| Incidin Active | 2.0 | dirty | 20 | 10 | xxxxxxxx Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444440 Pi = 0.875 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 3.38±0.25 | 0.125 |
| WSH | - | dirty | 20 | 10 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444440 Pi = 0.875 | 00000000 Pi = 0 | 7.38±0.25 | 0.125 |

| product | ac % | load | Temp (°C) | Time (min) | log dilution (s) | | | | | | | | Result(s) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | Titre | sm |
| Incidin Active | 2.0 | dirty | 20 | 15 | xxxxxxxx Pi = 1 | 44400000 Pi = 0.375 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 1.88±0.37 | 0.375 |
| WSH | - | dirty | 20 | 15 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444440 Pi = 0.875 | 00000000 Pi = 0 | 7.38±0.25 | 0.125 |

**Tab. 6 Calculated virus titres and logarithmic reduction factors incl. 95% confidence intervals**

| Product | Application concentration (%) | load | Cytotoxicity (log steps) | log-TCID $_{50}$ after ... | | | | | | >4 $\log_{10}$ decrease of virus particles after... |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 0 | 10 min | 15 min | 30 min | 60 min | 120 min | |
| Incidin Active | 2.0 | dirty conditions | 1.5 | 6.50±0.00 | 3.38±0.25 | 1.88±0.37 | Not done | Not done | Not done | 10 min |
| | | | | RF 0.75±0.33 | RF 4.00±0.35 | RF 5.50±0.44 | Not done | Not done | Not done | |
| WSH | - | dirty conditions | <0.5 | 7.25±0.33 | 7.38±0.25 | 7.38±0.25 | Not done | Not done | Not done | |
| | | | | | | | | | | |
| WSH control for formaldehyde | - | - | <0.5 | Not done | Not done | Not done | Not done | Not done | 7.25±0.33 | |
| Formaldehyde | 0.7 | - | 3.5 | Not done | Not done | Not done | 6.00±0.38 | 5.00±0.38 | 3.50±0.00 | Sufficient acc. EN14476 |
| | | | | Not done | Not done | Not done | RF 1.25±0.50 | RF 2.25±0.50 | RF ≥3.75±0.33 | |

**Tab. 7 Summary Efficacy data for Incidin Active against *Poliovirus,* type 1, LSc-2ab strain**

| Product | Ac (%) | load | Log $_{10}$ $TCID_{50}$/ml incl. 95% Confidence interval(s) after | | | | | | | RF incl. 95% Confidence interval(s) after | | | | | | | ≥4 $\log_{10}$ Reduction after...min |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 min | 5 min | 10 min | 15 min | 30min | 60 min | 120 min | 0 min | 5 min | 10 min | 15 min | 30min | 60 min | 120 min | |
| Incidin Active | 2.0 | dirty | 6.50±0.00 | | 3.38±0.25 | 1.88±0.37 | | | | RF 0.75±0.33 | | RF 4.00±0.35 | RF 5.50±0.44 | | | | 10 min |
| WSH | - | dirty | 7.25±0.33 | | 7.38±0.25 | 7.38±0.25 | | | | | | | | | | | |
| IF PBS | - | - | | | | | | 7.25±0.33 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| IF Product | 0.002 | - | | | | | | 7.25±0.33 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| DSA PBS | - | dirty | | | | | 7.38±0.25 | | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| DSA product | 2.0 | dirty | | | | | 7.25±0.33 | | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| WSH control | - | - | | | | | | | 7.25±0.33 | | | | | | | | |
| Formaldehyde | 0.7 | - | | | | | 6.00±0.38 | 5.00±0.38 | 3.50±0.00 | | | | | RF 1.25±0.50 | RF 2.25±0.50 | RF ≥3.75±0.33 | Sufficient acc. EN14476 |

IF = Interference control, DSA = disinfection suppressions assay

# Henkel AG & Co. KGaA

**Microbiology**

# Test Report

17-12768-4

Virucidal activity

of

**Incidin Active**
tested against

*Poliovirus*, type 1, LSc-2ab *strain*

**According to EN 14476**
Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
EN 14476:2013+A1:2015/prA2:2016 (01/2017)

| | |
|---|---|
| Client: | Ecolab Deutschland GmbH |
| Author: | A. Kyas |
| Date: | 2017-09-05 |

The following report consists of 11 pages and may be reproduced only completely

H e n k e l AG & Co. KGaA
HSA Corporate Scientific Services
D-40191 Düsseldorf

Tel.: (0211) 797-4693
Fax: (0211) 798-2245

## Content

Content ..... 2
1. Identity of the test institute ..... 2
2. Test substance ..... 2
3. Test method ..... 2
4. Experimental conditions ..... 2
5. Calculation of the virus titre ..... 6
6. Results ..... 7
7. Conclusion ..... 7
Table appendix .....
Tab. 1 Interference controls on host cells ..... 8
Tab. 2 Cytotoxicity controls on host cells ..... 8
Tab. 3 Formaldehyde control ..... 9
Tab. 4 DSA ..... 9
Tab. 5 Efficacy data / Titres / Reductionfactors ..... 9
Tab. 6 Calculated virus titre ..... 10
Tab. 8 Summery efficacy data ..... 11

## 1. Identity of the test institute

Henkel AG & Co. KGaA

HSA Corporate Scientific Services

D-40191 Düsseldorf

## 2. Test substance(s)

| | | **Incidin Active** |
|---|---|---|
| 2.1. | Product names | |
| 2.1.1 | Batch | 1386FM0107 |
| 2.1.2 | Formula No. | unknown |
| 2.1.3 | Laboratory No. | unknown |
| 2.1.4 | Manufacturing date | unknown |
| 2.1.5 | Expiry date | 09/2018 |
| 2.1.6 | Manufacturer | Ecolab Deutschland GmbH, Monheim |
| 2.1.7 | Date of sample entry | 2017-07-27 |
| 2.1.8 | Storage conditions in the laboratory | room temperature |
| 2.19 | Appearance | white and yellow granules |
| 2.1.10 | Active substance | PAA |

## 3. Test method

3.1 DIN EN 14476: Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine – Test method and requirements (phase 2, step 1) version EN 14476:2013+A1:2015/prA2:2016 (01/2017)

## 4. Experimental conditions

4.1 Test period

August 2017

4.2 Test concentration(s) / contact times

| | |
|---|---|
| 1.0% | 60 minutes |
| 0.5% | 60 minutes |
| 0.1% | 60 minutes |

The application concentrations and contact times were given by client.

4.3 Test structure

800µl Test product (x1.25)
+ 100µl dirty load
+ 100µl virus inoculum preparation

All assay ingredients were allowed to adjust to test temperature. The assays were performed in a temperature-controlled water bath.

4.4 Interfering substance(s)

Dirty conditions: final concentration: 3.0g/L BSA + 3.0g/L Erythrocytes

4.5 Appearance of the product dilution(s)

| | |
|---|---|
| 1.0% x 1.25 | clear, colorless, liquid, no precipitation |
| 0.5% x 1.25 | clear, colorless, liquid, no precipitation |
| 0.1% x 1.25 | clear, colorless, liquid, no precipitation |

Assay(s) with dirty load and virus-suspension:

| | |
|---|---|
| 1.0% | clear, light reddish, liquid, no precipitation |
| 0.5% | clear, light reddish, liquid, no precipitation |
| 0.1% | clear, reddish, liquid, no precipitation |

4.6 Test organisms / Host cells

*Poliovirus,* type 1, LSc-2ab strain- obtained from EUROVIR,
Passage 2 from 2016-07-24
RD (Rhabdomyosarcoma cells) – obtained from Steinmann
Passage 80 from 2017-08-15

4.7 Test temperature

20.0°C ± 1°C (water bath)

4.8 Procedure prior the test

All assay ingredients were allowed to adjust to test temperature. The assay was performed in a temperature-controlled water bath.
For the titer determination of the virus inoculum preparation blanks were done with **WSH** instead of test product.
After the contact time the reaction is annulled by transfer of 100µl aliquots to 900µl ice-cold supplemented DMEM + 2% FCS and serial 1:10-dilutions up to $10^{-9}$. As annulment verification this is already controlled at time 0. The recovery of residual active virus was performed in quantal tests on the corresponding host cells in microtitre plates using 8 parallels by transferring 100µl aliquots of each dilution to confluent monolayer cells.

After adequate incubation the cultures are read out for cytopathic effects (CPEs) with an inverse microscope. The effects are evaluated as follows:

0 = no cell damage = no virus activity
1 = <25% cell damage = virus activity
2 = ≈50% cell damage = virus activity
3 = ≈75% cell damage = virus activity
4 = ≈100% cell damage = virus activity

4.9 Neutralisation

Instantaneous dilutions of the test assays in ice-cold DMEM+2%FCS (1:10, 1:100 ...)

4.10 Reagents

| Reagent | Supplier | Batch / LOT | Best before |
|---|---|---|---|
| Bovine serum albumin (BSA) | Serva | 170146 | 10/2020 |
| Sheep Erythrocytes | Fiebig | 31231_100/01 | 2017-08-21 |
| DMEM FG0415 | Biochrom | 0730E | 07/2018 |
| Fetal calf serum (FCS) S0115 | Gibco | 0522D | 05/2021 |
| Formaldehyde (reference) | Applichem | 6M014885 | 09/2019 |
| 10xPBS | Gibco | 1775328 | 03/2018 |
| Trypsine/EDTA | Biochrom | 1002E | 09/2019 |
| Distilled water | HSA Microbiology | 2017062206-1 | 11/2017 |
| WSH (Hard water) | HSA Microbiology | 20170081501-1 | pH: 6.99, Fresh usage |
| D-PBS | Lonza | 6MB179 | 09/2018 |

4.11 Validation tes(t)s

All assays for cytotoxicity, interference, formaldehyde assay (reference), disinfection suppression were run at room temperature.

4.12 Cytotoxicity control(s)

| | |
|---|---|
| Products | 800µl Test product (x1.25)<br>+ 100µl dirty load<br>+ 100µl WSH |
| Formaldehyde | 500µl HCHO (1.4%)<br>+ 500µl WSH |

After mixing and direct serial 1:10-dilutions in ice-cold supplemented DMEM + 2% FCS monolayered host cells in microtitre plates are inoculated by 100µl aliquots in 8 parallels. After adequate incubation the cultures are read out for cytotoxic effects (CTEs) with an inverse microscope. The effects observed should be distinguished morphologically from CPEs and are evaluated as follows: 0 = no CTE; X = CTE.
If CTEs cannot be distinguished from CPEs, their degree may not exceed cytopathic cell damage in order to attribute the effect clearly to the virucidal properties of the test product.

4.13 Interference control(s)

100µl of the lowest non-cytotoxic dilution of the test product (here we report 1:1000) and 100µl PBS (control) respectively were transferred to 8 parallels monolayered host cells in microtiter plates. After 1h contact time at 36°C the supernatant is discarded and replaced by 100µl DMEM + 2% FCS -diluted virus inoculum preparation in dilution steps $10^{-2}$– $10^{-9}$.

After adequate incubation the cultures are read out for cytopathic effects (CPEs) with an inverse microscope. Only those dilutions may be used for RF-calculations, where the virus titers in the PBS-treated cells and in the product-treated cells may not differ <1lg.

4.14 Disinfection suppression assay

100µl Load
+100µl DMEM+2%FCS
+800µl Product (x1.25)

From each of the test assay an 100µl aliquot is withdrawn already at time 0±5sec. and immediately transferred to 800µl ice-cold supplemented DMEM +2% FCS adding on 100µl Virus suspension for 30 minutes. The virus titers may differ from the PBS control titer by ≤0.5lg.

4.15 Performance controls with formaldehyde

100µl virus inoculum preparation
+400µl PBS
*+500µl 1.4% solution* of formol (= 37% formaldehyde)
The actual concentration of this solution was analysed as 1.5% (w/v) formaldehyde

After contact times of 30, 60 and 120 minutes 100µl aliquots are withdrawn and transferred to ice-cold supplemented DMEM +2% FCS and serial 1:10 dilutions are prepared. 100µl aliquots of each dilution are plated on monolayered host cells in microtitre plates and after adequate incubation the cultures are read out for cytopathic effects (CPEs) with an inverse microscope.

## 5. Calculation of the virus titre

From the qualitative results of the residual infectivity the titre m of the infective virus particles in the original 1000µl aliquots may be re-calculated as 50% infective dose ($TCID_{50}$) by the method of *Spearman & Kärber*

$$\mathbf{m}\ (TCID_{50}) = \mathbf{X_k} + \mathbf{d/2} - \mathbf{d^*\Sigma p_i}$$

| | | |
|---|---|---|
| **m** | = | negative decadal logarithm $TCID_{50}$ in the first 1000µl aliquot |
| $\mathbf{X_k}$ | = | decadal logarithm of the first dilution where all parallels (here 8) are positive |
| **D** | = | decadal logarithm of the dilution factor (here 1) |
| $\mathbf{P_i}$ | = | ratio of positives in one series: |

| Positives | $P_i$ |
|---|---|
| 0/8 | 0.000 |
| 1/8 | 0.125 |
| 2/8 | 0.250 |
| 3/8 | 0.375 |
| 4/8 | 0.500 |
| 5/8 | 0.625 |
| 6/8 | 0.750 |
| 7/8 | 0.875 |
| 8/8 | 1.000 |

The standard deviation $\mathbf{S_m}$ is calculated according to the following formula

$$S_m = \sqrt{d^2 \sum \left[P_i \times (1 - P_i) \div (n - 1)\right]}$$

| | | |
|---|---|---|
| $\mathbf{S_m}$ | = | standard deviation of the logarithmic titre |
| **d** | = | decadal logarithm of the dilution factor (here 1) |
| $\mathbf{P_i}$ | = | ratio of positives in the parallels |

In many cases it is observed that $P_i = 1$ and $P_{i+2} = 0$. In case of a dilution series with a dilution factor of 10 and 8 parallels the above mentioned formula may then be simplified to

$$S_m = \sqrt{\left[P_{i+1} \times (1 - P_{i+1}) \div 7\right]}$$

**Calculation of the virucidal effect (logarithmic reduction factor of the infectivity)**

The virucidal effect of the tested product is calculated as logarithmic reduction factor **RF** = difference between the logarithmic virus control titres minus the residual logarithmic virus titres found for the product containing assays.

$$\mathbf{RF = log}\ (\text{Virus control CPE}) - \mathbf{log}\ (\text{Test product CPE})$$

in cases where the cytotoxic effects (CTE) exceed the cytopathic effects (CPE) the calculated reduction factors are indicated as "≥".The confidence intervals $\mathbf{K_{RF}}$ of the reduction factors are calculated following the formula:

$$K_{RF} = \sqrt{(2S_{m(control)})^2 + (2S_{m(residualtiter)})^2}$$

## 6. Results

| Incidin Active | | | |
|---|---|---|---|
| Parameter(s) | | logarithmic reduction factor(s) incl. 95% confidence interval(s) against *Poliovirus,* type 1, LSc-2ab strain | |
| Application conc. | contact time | clean conditions | dirty conditions |
| 1.0% | 0 min | Not done | 0.38±0.49 |
| 0.5% | 0 min | Not done | 0.25±0.52 |
| 0.1% | 0 min | Not done | 0.25±0.52 |
| | | | |
| 1.0% | 60 min | Not done | 4.50±0.44 |
| 0.5% | 60 min | Not done | 1.75±0.52 |
| 0.1% | 60 min | Not done | 0.13±0.49 |

## 7. Conclusion

Incidin Active was tested for virucidal efficiency acc. to EN 14476:2013+A1:2015/prA2:2016 (01/2017) in a suspension test against surrogate viruses.

For a sufficient efficacy, this norm requires a reduction of virus titre of ≥4.0lg. Here we report the results against the non-enveloped *Poliovirus,* type 1, LSc-2ab strain.

The product met the requirements with a concentration of **1.0% within 60 minutes at 20°C under dirty conditions** based on the results of the EN 14476-test method.

Düsseldorf, 2017-09-05

Ulrich Bäumer
Head of Laboratory

Andrea Kyas
Laboratory

Copy of the original signed version of this report and the raw data are filed at HSA Corporate Scientific Services / Microbiology for a storage period of 10 years

## Table appendix

### Interference controls on RD cells

m = Titer as $log_{10}$-$TCID_{50}$/ml acc. *Spearman* & *Kärber*; $P_i$ = Ratio of positives in a series of parallels

| assay | product | load | Product dilution | log dilution | | | | | | | | m incl. 95% confidence interval |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | |
| Interference-control(s) | PBS | w/o | - | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44000000 Pi = 0.250 | 00000000 Pi = 0 | 6.75±0.33 |
| | Incidin Active | w/o | 0.002% | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44400000 Pi = 0.375 | 00000000 Pi = 0 | 6.88±0.37 |

### Tab. 2 Cytotoxicity controls (x) on RD cells

| assay | load | Host cell(s) | log dilution | | | | | | | | Cell control | m |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | | |
| Incidin Active 1.0% | dirty | RD | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | <0.5±0.0 |
| Incidin Active 0.5% | dirty | RD | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | <0.5±0.0 |
| Incidin Active 0.1% | dirty | RD | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | <0.5±0.0 |
| DMEM+5%FCS | dirty | RD | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | <0.5±0.0 |
| WSH | dirty | RD | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | <0.5±0.0 |
| Formaldehyde 0.75% | without | RD | xxxxxxxx | xxxxxxxx | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 3.5±0.0 |

### Tab. 3 Formaldehyde control against *Poliovirus,* type 1, LSc-2ab strain

| | t (min.) | log dilution | | | | | | | | Cell-control | m incl. 95% ci | log RF incl. 96%ci |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | | | |
| Assay HCHO | 30 | Not done | xxxxxxxx | xxxxxxxx | 44444444 | 44440000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 5.00±0.38 | 1.88±0.53 |
| | 60 | Not done | xxxxxxxx | xxxxxxxx | 44000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 3.75±0.33 | 3.13±0.49 |
| | 120 | Not done | xxxxxxxx | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 3.50±0.00 | 3.38±0.37 |
| | t (min.) | log dilution | | | | | | | | Cell-control | m | |
| WSH control | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | | | |
| | 120 | Not done | 44444444 | 44444444 | 44444444 | 44444444 | 44444444 | 44400000 | 00000000 | 00000000 | 6.88±0.37 | |

The formaldehyde concentration was analytically determined as 1.5% resulting to an assay concentration of 0.75%.

## Tab 4. Disinfection suppression assay(s)

| Disinfection suppression assay(s) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Product** | **Application conc (%)** | **Load** | **Time** | **titre** | **Sufficient according to EN14476** |
| PBS | - | Dirty | 30 min. | 6.75±0.33 | |
| Incidin Active | 1.0 | Dirty | 30 min. | 6.88±0.37 | Yes |
| Incidin Active | 0.5 | Dirty | 30 min. | 7.00±0.38 | Yes |
| Incidin Active | 0.1 | Dirty | 30 min. | 6.88±0.37 | Yes |

## Tab. 5 Efficacy data of Incidin Active against *Poliovirus,* type 1, LSc-2ab strain

| product | ac % | load | Temp (°C) | Time (min) | log dilution (s) | | | | | | | | Result(s) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | Titre | sm |
| Incidin Active | 1.0 | dirty | 20 | 0 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44000000 Pi = 0.250 | 00000000 Pi = 0 | 6.75±0.33 | 0.164 |
| Incidin Active | 0.5 | dirty | 20 | 0 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44400000 Pi = 0.375 | 00000000 Pi = 0 | 6.88±0.37 | 0.183 |
| Incidin Active | 0.1 | dirty | 20 | 0 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44400000 Pi = 0.375 | 00000000 Pi = 0 | 6.88±0.37 | 0.183 |
| WSH | - | dirty | 20 | 0 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444000 Pi = 0.625 | 00000000 Pi = 0 | 7.13±0.37 | 0.183 |

| product | ac % | load | Temp (°C) | Time (min) | log dilution (s) | | | | | | | | Result(s) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | Titre | sm |
| Incidin Active | 1.0 | dirty | 20 | 60 | 44444440 Pi = 0.875 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 1.38±0.25 | 0.125 |
| Incidin Active | 0.5 | dirty | 20 | 60 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444000 Pi = 0.625 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 5.13±0.37 | 0.183 |
| Incidin Active | 0.1 | dirty | 20 | 60 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44000000 Pi = 0.250 | 00000000 Pi = 0 | 6.75±0.33 | 0.164 |
| WSH | - | dirty | 20 | 60 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44400000 Pi = 0.375 | 00000000 Pi = 0 | 6.88±0.37 | 0.183 |

**Tab. 6 Calculated virus titres and logarithmic reduction factors incl. 95% confidence intervals**

| Product | Application concentration (%) | load | Cytotoxicity (log steps) | log-TCID $_{50}$ after ... | | | | | >4 $log_{10}$ decrease of virus particles after... |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 0 | 10 min | 30 min | 60 min | 120 min | |
| Incidin active | 1.0 | dirty conditions | <0.5 | 6.75±0.33 | 6.75±0.33 | | 1.38±0.25 | | Sufficient within 60 min |
| | | | | RF 0.38±0.49 | RF 0.13±0.49 | | RF 4.50±0.44 | | |
| | 0.5 | dirty conditions | <0.5 | 6.88±0.37 | 6.63±0.25 | | 5.13±0.37 | | Not sufficient within 60 min |
| | | | | RF 0.25±0.52 | RF 0.25±0.44 | | RF 1.75±0.52 | | |
| | 0.1 | dirty conditions | <0.5 | 6.88±0.37 | | | 6.75±0.33 | | Not sufficient within 60 min |
| | | | | RF 0.25±0.52 | | | RF 0.13±0.49 | | |
| WSH | - | dirty conditions | <0.5 | 7.13±0.37 | 6.88±0.37 | | 6.88±0.37 | | |
| WSH control for formaldehyde | - | - | <0.5 | | | | | 6.88±0.37 | |
| Formaldehyde | 0.75 | - | 3.5 | | | 5.00±0.38 | 3.75±0.33 | 3.50±0.00 | Sufficient acc. EN14476 |
| | | | | | | RF 1.88±0.53 | RF 3.13±0.49 | RF ≥3.38±0.37 | |

## Tab. 7.0 Summary Efficacy data for Incidin Active against *Poliovirus*, type 1, LSc-2ab strain

| Product | Ac (%) | load | Log $_{10}$ $TCID_{50}$/ml incl. 95% Confidence interval(s) after | | | | | | RF incl. 95% Confidence interval(s) after | | | | | | ≥4 $log_{10}$ Reduction after...min |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 min | 5 min | 10 min | 30min | 60 min | 120 min | 0 min | 5 min | 10 min | 30min | 60 min | 120 min | |
| Incidin active | 1.0 | dirty | 6.75±0.33 | | 6.75±0.33 | | 1.38±0.25 | | RF 0.38±0.49 | | RF 0.13±0.49 | | RF 4.50±0.44 | | Sufficient within 60 min |
| | 0.5 | dirty | 6.88±0.37 | | 6.63±0.25 | | 5.13±0.37 | | RF 0.25±0.52 | | RF 0.25±0.44 | | RF 1.75±0.52 | | Not sufficient |
| | 0.1 | dirty | 6.88±0.37 | | | | 6.75±0.33 | | RF 0.25±0.52 | | | | RF 0.13±0.49 | | Not sufficient |
| WSH | - | dirty | 7.13±0.37 | | 6.88±0.37 | | 6.88±0.37 | | | | | | | | |
| IF PBS | - | - | | | | | 6.75±0.33 | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| IF Product | 0.002 | - | | | | | 6.88±0.37 | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| DSA PBS | - | dirty | | | | 6.75±0.33 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| DSA Product | 1.0 | dirty | | | | 6.88±0.37 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| | 0.5 | dirty | | | | 7.00±0.38 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| | 0.1 | dirty | | | | 6.88±0.37 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| WSH control | - | - | | | | 5.00±0.38 | 3.75±0.33 | 3.50±0.00 | | | | | | | |
| Formaldehyde | 0.75 | - | | | | | | 6.88±0.37 | | | | RF 1.88±0.53 | RF 3.13±0.49 | RF ≥3.38±0.37 | Sufficient acc. EN14476 |

IF = Interference control, DSA = disinfection suppressions assay

Henkel AG & Co. KGaA

Microbiology

# Test Report

17-12768-2

Virucidal activity

of

**Incidin Active**
tested against

*Murine Norovirus,* S99, Berlin/06/DE strain

**According to EN 14476**
Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
EN 14476:2013+A1:2015/prA2:2016 (01/2017)

| | |
|---|---|
| Client: | Ecolab Deutschland GmbH |
| Author: | A. Kyas |
| Date: | 2017-08-24 |

The following report consists of 12 pages and may be reproduced only completely

H e n k e l AG & Co. KGaA
HSA Corporate Scientific Services
D-40191 Düsseldorf

Tel.: (0211) 797-4693
Fax: (0211) 798-2245

## Content

Content ..... 2
1. Identity of the test institute ..... 2
2. Test substance ..... 2
3. Test method ..... 2
4. Experimental conditions ..... 2
5. Calculation of the virus titre ..... 6
6. Results ..... 7
7. Conclusion ..... 7
Table appendix .....
Tab. 1 Interference controls on host cells ..... 8
Tab. 2 Cytotoxicity controls on host cells ..... 8
Tab. 3 Formaldehyde control ..... 9
Tab. 4 DSA ..... 9
Tab. 5 Efficacy data / Titres / Reductionfactors ..... 10
Tab. 6 Calculated virus titre ..... 11
Tab. 8 Summery efficacy data ..... 12

## 1. Identity of the test institute

Henkel AG & Co. KGaA

HSA Corporate Scientific Services

D-40191 Düsseldorf

## 2. Test substance(s)

| | | |
|---|---|---|
| 2.1. | Product names | **Incidin Active** |
| 2.1.1 | Batch | 1386FM0107 |
| 2.1.2 | Formula No. | unknown |
| 2.1.3 | Laboratory No. | unknown |
| 2.1.4 | Manufacturing date | unknown |
| 2.1.5 | Expiry date | 09/2018 |
| 2.1.6 | Manufacturer | Ecolab Deutschland GmbH, Monheim |
| 2.1.7 | Date of sample entry | 2017-07-27 |
| 2.1.8 | Storage conditions in the laboratory | room temperature |
| 2.19 | Appearance | white and yellow granules |
| 2.1.10 | Active substance | PAA |

## 3. Test method

3.1 DIN EN 14476: Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine – Test method and requirements (phase 2, step 1) version EN 14476:2013+A1:2015/prA2:2016 (01/2017)

## 4. Experimental conditions

4.1 Test period

August 2017

4.2 Test concentration(s) / contact times

| | |
|---|---|
| 2.0% | 10 minutes |
| 1.0% | 10 minutes |
| 0.5% | 10 minutes |
| 1.0% | 60 minutes |
| 0.5% | 60 minutes |
| 0.1% | 60 minutes |

The application concentrations and contact times were given by client.

4.3 Test structure

800µl Test product (x1.25)
+ 100µl dirty load
+ 100µl virus inoculum preparation

All assay ingredients were allowed to adjust to test temperature. The assays were performed in a temperature-controlled water bath.

4.4 Interfering substance(s)

Dirty conditions: final concentration: 3.0g/L BSA + 3.0g/L Erythrocytes

4.5 Appearance of the product dilution(s)

| | |
|---|---|
| 2.0% x 1.25 | clear, colorless, liquid, no precipitation |
| 1.0% x 1.25 | clear, colorless, liquid, no precipitation |
| 0.5% x 1.25 | clear, colorless, liquid, no precipitation |
| 0.1% x 1.25 | clear, colorless, liquid, no precipitation |

Assay(s) with dirty load and virus-suspension:

| | |
|---|---|
| 2.0% | clear, colorless, liquid, no precipitation |
| 1.0% | clear, light reddish, liquid, no precipitation |
| 0.5% | clear, light reddish, liquid, no precipitation |
| 0.1% | clear, reddish, liquid, no precipitation |

4.6 Test organisms / Host cells

*Murine Norovirus* S99 (=MNV), strain Berlin/06/06/DE - obtained from RKI
Passage 18 from 2008-08-14

Host cells / description
TIB-71 (RAW 264.7) obtained from ATCC, Passage 12 from 2017-08-16
Organism: *Mus musculus* (mouse)

Tissue: monocyte; macrophage; Abelson murine leukemia virus-induced tumor; ascites
Gender: male
Morphology: monocyte / macrophage

4.7 Test temperature

20.0°C ± 1°C (water bath)

4.8 Procedure prior the test

All assay ingredients were allowed to adjust to test temperature. The assay was performed in a temperature-controlled water bath.
For the titer determination of the virus inoculum preparation blanks were done with **WSH** instead of test product.
After the contact time the reaction is annulled by transfer of 100µl aliquots to 900µl ice-cold supplemented DMEM + 5% FCS and serial 1:10-dilutions up to $10^{-9}$. As annulment verification this is already controlled at time 0. The recovery of residual active virus was performed in quantal tests on the corresponding host cells in microtitre plates using 8 parallels by transferring 100µl aliquots of each dilution to confluent monolayer cells.

After adequate incubation the cultures are read out for cytopathic effects (CPEs) with an inverse microscope. The effects are evaluated as follows:

0 = no cell damage = no virus activity
1 = <25% cell damage = virus activity
2 = ≈50% cell damage = virus activity
3 = ≈75% cell damage = virus activity
4 = ≈100% cell damage = virus activity

4.9 Neutralisation

Instantaneous dilutions of the test assays in ice-cold DMEM+5%FCS (1:10, 1:100 ...)

4.10 Reagents

| Reagent | Supplier | Batch / LOT | Best before |
|---|---|---|---|
| Bovine serum albumin (BSA) | Serva | 170146 | 10/2020 |
| Sheep Erythrocytes | Fiebig | 31231_100/01 | 2017-08-21 |
| DMEM FG0415 | Biochrom | 0730E | 07/2018 |
| Fetal calf serum (FCS) S0115 | Gibco | 0522D | 05/2021 |
| Formaldehyde (reference) | Applichem | 6M014885 | 09/2019 |
| 10xPBS | Gibco | 1775328 | 03/2018 |
| Trypsine/EDTA | Biochrom | 1002E | 09/2019 |
| Distilled water | HSA Microbiology | 2017062206-1 | 11/2017 |
| WSH (Hard water) | HSA Microbiology | 2017081701-1 | pH: 7.01, Fresh usage |
| D-PBS | Lonza | 6MB179 | 09/2018 |

4.11 Validation tes(t)s

All assays for cytotoxicity, interference, formaldehyde assay (reference), disinfection suppression were run at room temperature.

4.12 Cytotoxicity control(s)

| | |
|---|---|
| Products | 800µl Test product (x1.25)<br>+ 100µl dirty load<br>+ 100µl WSH |
| Formaldehyde | 500µl HCHO (1.4%)<br>+ 500µl WSH |

After mixing and direct serial 1:10-dilutions in ice-cold supplemented DMEM + 5% FCS monolayered host cells in microtitre plates are inoculated by 100µl aliquots in 8 parallels. After adequate incubation the cultures are read out for cytotoxic effects (CTEs) with an inverse microscope. The effects observed should be distinguished morphologically from CPEs and are evaluated as follows: 0 = no CTE; X = CTE.
If CTEs cannot be distinguished from CPEs, their degree may not exceed cytopathic cell damage in order to attribute the effect clearly to the virucidal properties of the test product.

4.13 Interference control(s)

100µl of the lowest non-cytotoxic dilution of the test product (here we report 1:1000) and 100µl PBS (control) respectively were transferred to 8 parallels monolayered host cells in microtiter plates. After 1h contact time at 36°C the supernatant is discarded and replaced by 100µl DMEM + 5% FCS -diluted virus inoculum preparation in dilution steps $10^{-2}$– $10^{-9}$.

After adequate incubation the cultures are read out for cytopathic effects (CPEs) with an inverse microscope. Only those dilutions may be used for RF-calculations, where the virus titers in the PBS-treated cells and in the product-treated cells may not differ <1lg.

4.14 Disinfection suppression assay

100µl Load
+100µl DMEM+5%FCS
+800µl Product (x1.25)

From each of the test assay an 100µl aliquot is withdrawn already at time 0±5sec. and immediately transferred to 800µl ice-cold supplemented DMEM +5% FCS adding on 100µl Virus suspension for 30 minutes. The virus titers may differ from the PBS control titer by ≤0.5lg.

4.15 Performance controls with formaldehyde

100µl virus inoculum preparation
+400µl PBS
*+500µl 1.4% solution* of formol (= 37% formaldehyde)
The actual concentration of this solution was analysed as 1.5% (w/v) formaldehyde

After contact times of 30 and 60 minutes 100µl aliquots are withdrawn and transferred to ice-cold supplemented DMEM + 5% FCS and serial 1:10 dilutions are prepared. 100µl aliquots of each dilution are plated on monolayered host cells in microtitre plates and after adequate incubation the cultures are read out for cytopathic effects (CPEs) with an inverse microscope.

## 5. Calculation of the virus titre

From the qualitative results of the residual infectivity the titre m of the infective virus particles in the original 1000µl aliquots may be re-calculated as 50% infective dose ($TCID_{50}$) by the method of *Spearman & Kärber*

$$\mathbf{m}\ (TCID_{50}) = \mathbf{X_k} + \mathbf{d/2} - \mathbf{d^*\Sigma p_i}$$

| | | |
|---|---|---|
| **m** | = | negative decadal logarithm $TCID_{50}$ in the first 1000µl aliquot |
| $\mathbf{X_k}$ | = | decadal logarithm of the first dilution where all parallels (here 8) are positive |
| **D** | = | decadal logarithm of the dilution factor (here 1) |
| $\mathbf{P_i}$ | = | ratio of positives in one series: |

| Positives | $P_i$ |
|---|---|
| 0/8 | 0.000 |
| 1/8 | 0.125 |
| 2/8 | 0.250 |
| 3/8 | 0.375 |
| 4/8 | 0.500 |
| 5/8 | 0.625 |
| 6/8 | 0.750 |
| 7/8 | 0.875 |
| 8/8 | 1.000 |

The standard deviation $\mathbf{S_m}$ is calculated according to the following formula

$$\mathbf{S_m} = \sqrt{\mathbf{d^2} \sum \left[\mathbf{P_i} \times \left(\mathbf{1} - \mathbf{P_i}\right) \div \left(\mathbf{n} - \mathbf{1}\right)\right]}$$

| | | |
|---|---|---|
| $\mathbf{S_m}$ | = | standard deviation of the logarithmic titre |
| **d** | = | decadal logarithm of the dilution factor (here 1) |
| $\mathbf{P_i}$ | = | ratio of positives in the parallels |

In many cases it is observed that $P_i = 1$ and $P_{i+2} = 0$. In case of a dilution series with a dilution factor of 10 and 8 parallels the above mentioned formula may then be simplified to

$$\mathbf{S_m} = \sqrt{\left[\mathbf{P_{i+1}} \times \left(\mathbf{1} - \mathbf{P_{i+1}}\right) \div \mathbf{7}\right]}$$

**Calculation of the virucidal effect (logarithmic reduction factor of the infectivity)**

The virucidal effect of the tested product is calculated as logarithmic reduction factor **RF** = difference between the logarithmic virus control titres minus the residual logarithmic virus titres found for the product containing assays.

$$\mathbf{RF = log}\ (\text{Virus control CPE}) \mathbf{-\ log}\ (\text{Test product CPE})$$

in cases where the cytotoxic effects (CTE) exceed the cytopathic effects (CPE) the calculated reduction factors are indicated as "≥".The confidence intervals $\mathbf{K_{RF}}$ of the reduction factors are calculated following the formula:

$$\mathbf{K_{RF}} = \sqrt{(2\mathbf{S_{m(control)}})^2 + (2\mathbf{S_{m(residualtiter)}})^2}$$

## 6. Results

| Incidin Active | | | |
|---|---|---|---|
| Parameter(s) | | logarithmic reduction factor(s) incl. 95% confidence interval(s) against *Murine Norovirus-S99,* Berlin/06/DE strain | |
| Application conc. | contact time | clean conditions | dirty conditions |
| 2.0% | 0 min | Not done | 4.38±0.37 |
| 1.0% | 0 min | Not done | 4.38±0.37 |
| 0.5% | 0 min | Not done | 2.38±0.37 |
| 0.1% | 0 min | Not done | 0.38±0.37 |
| | | | |
| 2.0% | 10 min | Not done | ≥5.38±0.37 |
| 1.0% | 10 min | Not done | ≥5.38±0.37 |
| 0.5% | 10 min | Not done | ≥5.38±0.37 |
| | | | |
| 1.0% | 60 min | Not done | ≥5.38±0.37 |
| 0.5% | 60 min | Not done | ≥5.38±0.37 |
| 0.1% | 60 min | Not done | ≥5.38±0.37 |

## 7. Conclusion

Incidin Active was tested for virucidal efficiency acc. to EN 14476:2013+A1:2015/prA2:2016 (01/2017) in a suspension test against surrogate viruses.

For a sufficient efficacy, this norm requires a reduction of virus titre of ≥4.0lg. Here we report the results against the non-enveloped *Murine Norovirus-S99,* Berlin/06/DE strain.

The product met the requirements with a concentration of:

**0.5% / 1.0% and 2% within 10 minutes at 20°C under dirty conditions**

**and 0.1% / 0.5% and 1.0% within 60 minutes at 20°C under dirty conditions**

based on the results of the EN 14476-test method.

Düsseldorf, 2017-08-24

Dr. Roland Breves
Head of Microbiology

Andrea Kyas
Laboratory

## Table appendix

### Interference controls on TIB cells

m = Titer as $log_{10}$-$TCID_{50}$/ml acc. *Spearman & Kärber*; $P_i$ = Ratio of positives in a series of parallels

| assay | product | load | Product dilution | log dilution | | | | | | | | m incl. 95% confidence interval |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | |
| Interference-control(s) | PBS | w/o | - | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44000000 Pi = 0.250 | 00000000 Pi = 0 | 6.75±0.33 |
| | Incidin Active | w/o | 1:1000 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 44444444 Pi = 1.0 | 40000000 Pi = 0.125 | 00000000 Pi = 0 | 6.63±0.25 |

### Tab. 2 Cytotoxicity controls (x) on TIB cells

| assay | load | Host cell(s) | log dilution | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | Cell control | m |
| Incidin Active 2.0% | dirty | TIB | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 1.5±0.0 |
| Incidin Active 1.0% | dirty | | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 1.5±0.0 |
| Incidin Active 0.5% | dirty | | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 1.5±0.0 |
| Incidin Active 0.1% | dirty | | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 1.5±0.0 |
| DMEM+5%FCS | dirty | | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | <0.5±0.0 |
| WSH | dirty | | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | <0.5±0.0 |
| Formaldehyde 0.75% | without | | xxxxxxxx | xxxxxxxx | xxxxxxxx | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 3.5±0.0 |

## Tab. 3 Formaldehyde control against *Murine Norovirus-S99,* Berlin/06/DE strain

| Assay HCHO | t (min.) | log dilution | | | | | | | | Cell-control | m incl. 95% ci | log RF incl. 96%ci |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | | | |
| | 30 | Not done | xxxxxxxx | xxxxxxxx | 44400000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 3.88±0.37 | 2.88±0.49 |
| | 60 | Not done | xxxxxxxx | xxxxxxxx | 44000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 00000000 | 3.75±0.33 | 3.00±0.46 |
| WSH control | t (min.) | log dilution | | | | | | | | Cell-control | m | |
| | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | | | |
| | 60 | Not done | 44444444 | 44444444 | 44444444 | 44444444 | 44444444 | 44000000 | 00000000 | 00000000 | 6.75±0.33 | |

The formaldehyde concentration was analytically determined as 1.5% resulting to an assay concentration of 0.75%.

## Tab 4. Disinfection suppression assay(s)

| Disinfection suppression assay(s) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Product** | **Application conc (%)** | **Load** | **Time** | **titre** | **Sufficient according to EN14476** |
| PBS | - | Dirty | 30 min. | 6.75±0.33 | |
| Incidin Active | 2.0 | Dirty | 30 min. | 6.63±0.25 | Yes |
| Incidin Active | 1.0 | Dirty | 30 min. | 6.75±0.33 | Yes |
| Incidin Active | 0.5 | Dirty | 30 min. | 6.75±0.33 | Yes |
| Incidin Active | 0.1 | Dirty | 30 min. | 6.75±0.33 | Yes |

## Tab. 5 Efficacy data of Incidin Active against *Murine Norovirus-S99,* Berlin/06/DE strain

| product | ac % | load | Temp (°C) | Time (min) | log dilution (s) | | | | | | | | Result(s) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | Titre | sm |
| Incidin Active | 2.0 | dirty | 20 | 0 | xxxxxxxx Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 40000000 Pi = 0.125 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 2.63±0.25 | 0.125 |
| Incidin Active | 1.0 | dirty | 20 | 0 | xxxxxxxx Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 2.50±0.00 | 0.000 |
| Incidin Active | 0.5 | dirty | 20 | 0 | xxxxxxxx Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 4.50±0.00 | 0.000 |
| Incidin Active | 0.1 | dirty | 20 | 0 | xxxxxxxx Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 6.50±0.00 | 0.000 |
| WSH | - | dirty | 20 | 0 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44400000 Pi = 0.375 | 00000000 Pi = 0 | 6.88±0.37 | 0.183 |

| product | ac % | load | Temp (°C) | Time (min) | log dilution (s) | | | | | | | | Result(s) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | Titre | sm |
| Incidin Active | 2.0 | dirty | 20 | 10 | xxxxxxxx Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 1.50±0.00 | 0.000 |
| Incidin Active | 1.0 | dirty | 20 | 10 | xxxxxxxx Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 1.50±0.00 | 0.000 |
| Incidin Active | 0.5 | dirty | 20 | 10 | xxxxxxxx Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 1.50±0.00 | 0.000 |
| WSH | - | dirty | 20 | 10 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44400000 Pi = 0.375 | 00000000 Pi = 0 | 6.88±0.37 | 0.183 |

| product | ac % | load | Temp (°C) | Time (min) | log dilution (s) | | | | | | | | Result(s) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | Titre | sm |
| Incidin Active | 1.0 | dirty | 20 | 60 | xxxxxxxx Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 1.50±0.00 | 0.000 |
| Incidin Active | 0.5 | dirty | 20 | 60 | xxxxxxxx Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 1.50±0.00 | 0.000 |
| Incidin Active | 0.1 | dirty | 20 | 60 | xxxxxxxx Pi = 1 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 00000000 Pi = 0 | 1.50±0.00 | 0.000 |
| WSH | - | dirty | 20 | 60 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44444444 Pi = 1 | 44400000 Pi = 0.375 | 00000000 Pi = 0 | 6.88±0.37 | 0.183 |

**Tab. 6 Calculated virus titres and logarithmic reduction factors incl. 95% confidence intervals**

| Product | Application concentration (%) | load | Cytotoxicity (log steps) | log-TCID $_{50}$ after ... | | | | | >4 $log_{10}$ decrease of virus particles after... |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 0 | 10 min | 30 min | 60 min | 120 min | |
| Incidin Active | 2.0 | dirty conditions | 1.5 | 2.63±0.25 | 1.50±0.00 | | | | sufficient within 10 min |
| | | | | RF 4.25±0.44 | RF ≥5.38±0.37 | | | | |
| | 1.0 | dirty conditions | 1.5 | 2.50±0.00 | 1.50±0.00 | | 1.50±0.00 | | sufficient within 10 min |
| | | | | RF 4.38±0.37 | RF ≥5.38±0.37 | | RF ≥5.38±0.37 | | |
| | 0.5 | dirty conditions | 1.5 | 4.50±0.00 | 1.50±0.00 | | 1.50±0.00 | | sufficient within 10 min |
| | | | | RF 2.38±0.37 | RF ≥5.38±0.37 | | RF ≥5.38±0.37 | | |
| | 0.1 | dirty conditions | 1.5 | 6.50±0.00 | | | 1.50±0.00 | | sufficient within 60 min |
| | | | | RF 0.38±0.37 | | | RF ≥5.38±0.37 | | |
| WSH | - | dirty conditions | <0.5 | 6.88±0.37 | 6.88±0.37 | | 6.88±0.37 | | |
| WSH control for formaldehyde | - | - | <0.5 | | | | 6.75±0.33 | | |
| Formaldehyde | 0.75 | - | 3.5 | | | 3.88±0.37 | 3.75±0.33 | | Not applicable |
| | | | | | | RF 2.88±0.49 | RF 3.00±0.46 | | |

## Tab. 7.0 Summary Efficacy data for Incidin Active against *Murine Norovirus-S99*, Berlin/06/DE strain

| Product | Ac (%) | load | Log $_{10}$ $TCID_{50}$/ml incl. 95% Confidence interval(s) after | | | | | | RF incl. 95% Confidence interval(s) after | | | | | | ≥4 $log_{10}$ Reduction after...min |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 min | 5 min | 10 min | 30min | 60 min | 120 min | 0 min | 5 min | 10 min | 30min | 60 min | 120 min | |
| Incidin Active | 2.0 | dirty | 2.63±0.25 | | 1.50±0.00 | | | | RF 4.25±0.44 | | RF ≥5.38±0.37 | | | | Sufficient within 10 min |
| | 1.0 | dirty | 2.50±0.00 | | 1.50±0.00 | | 1.50±0.00 | | RF 4.38±0.37 | | RF ≥5.38±0.37 | | RF ≥5.38±0.37 | | Sufficient within 10 min |
| | 0.5 | dirty | 4.50±0.00 | | 1.50±0.00 | | 1.50±0.00 | | RF 2.38±0.37 | | RF ≥5.38±0.37 | | RF ≥5.38±0.37 | | Sufficient within 10 min |
| | 0.1 | dirty | 6.50±0.00 | | | | 1.50±0.00 | | RF 0.38±0.37 | | | | RF ≥.38±0.37 | | Sufficient within 60 min |
| WSH | - | dirty | 6.88±0.37 | | 6.88±0.37 | | 6.88±0.37 | | | | | | | | |
| IF PBS | - | - | | | | | 6.75±0.33 | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| IF Product | 0.002 | - | | | | | 6.63±0.25 | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| DSA PBS | - | dirty | | | | 6.75±0.33 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| DSA control product | 2.0 | dirty | | | | 6.63±0.25 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| | 1.0 | dirty | | | | 6.75±0.33 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| | 0.5 | dirty | | | | 6.75±0.33 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| | 0.1 | dirty | | | | 6.75±0.33 | | | | | | | | | Sufficient acc. EN14476 |
| WSH control | - | - | | | | | 6.75±0.33 | | | | | | | | |
| Formaldehyde | 0.75 | - | | | | 3.88±0.37 | 3.75±0.33 | | | | | RF 2.88±0.49 | RF 3.00±0.46 | | Not applicable |

IF = Interference control, DSA = disinfection suppressions assay

Laboratoires ANIOS
Laboratoire de microbiologie

cofrac ESSAIS
ACCREDITATION N°1-6419 PORTEE DISPONIBLE SUR WWW.COFRAC.FR

Sainghin en Mélantois, le 21 septembre 2017
*Sainghin en Mélantois, on the September 21 th 2017*

Rapport d'essai : N° A 17 126 13624
*Test report : N° A 17 126 13624*

## 1. Objet de la demande *(Study Number)* n° 35885

Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité levuricide de la formule **FC 913019.** Méthode d'essai et prescriptions (phase 2 - étape 1) NF EN 13624 (Novembre 2013). Application aux désinfectants chimiques dans le domaine médical.
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 **FC 913019.** Test method and prescriptions (phase 2 - step 1) according to NF EN 13624 (November 2013). Application to chemical disinfectants in medical area.*
*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 *(Study Number)* n° 35885 1

2. Sommaire *(Summary)* 2

3. Introduction *(Introduction)* 3

4. Identification de l'échantillon *(Sample Identification)* 3

5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)* 4

   5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)* 4
   5.2. Méthode par dilution neutralisation *(Method by dilution neutralisation)* 4

6. Résultats *(Results)* 5

   6.1. Essais de validation des conditions expérimentales *(Validation tests)* 5
   6.2. Essais d'activité levuricide *(Evaluation of yeasticidal activity)* 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<br>*Code formula* | **FC 913019** |
| Numéro d'identification de l'échantillon<br>*Identification of the sample* | **4661 17 08 13624** |
| Numéro de lot<br>*Batch number* | **2446FM0410** |
| Fabricant<br>*Manufacturer* | **ECOLAB** |
| Date de réception au laboratoire<br>*Receipt date at the laboratory* | Le 31/07/17<br>*On the 31/07/17* |
| Conditions de stockage au laboratoire<br>*Storage conditions at the laboratory* | T° ambiante et obscurité<br>*Room temperature and darkness* |
| Substances actives<br>*Activ substances* | Solution à 20g/l : > 1000 ppm acide peracetique(CAS 79-21-0)<br>*Solution of 20g/l : > 1000 ppm peracetic acid (CAS 79-21-0)* |
| Période d'essai<br>*Period of analysis* | Du 04/08/17 au 07/08/17<br>*From 04/08/17 to 07/08/17* |

## 5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)*

### 5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)*

| | |
|---|---|
| Température de l'essai<br>*Test temperature* | 20°C ± 1°C |
| Temps de contact<br>*Contact Time* | **5 minutes** ± 10s |
| Diluant de la formule lors des essais | Eau dure |
| *Diluent of the formula used during the test* | *Hard water* |
| Apparence de la formule et de ses dilutions | Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai |
| *Appearance formula dilutions* | *Preparation physically homogeneous and stable during test* |
| Souche testée<br>*Tested strain* | ○ **Candida albicans DSM 1386 (équivalent ATCC 10231)** |
| Pourcentage de spores échinulées | Non concerné |
| *Spiny spores percentage* | *Not concerned* |
| Substance interférente | Albumine bovine à 3g/l + 3ml/l érythrocytes |
| *Interfering substance* | *3 g/l BSA + 3ml/l erythrocytes* |
| Stabilité du mélange formule et substances interférentes | Absence de précipité pendant l'essai |
| *Stability of the mixture (formula and interfering substance)* | *Precipitate absent throughout the test* |
| Température d'incubation | 30°C ± 1°C |
| *Incubation temperature* | *30°C ± 1°C* |

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

| | |
|---|---|
| Nature du neutralisant utilisé | ○ Formule : F002 |
| *Nature of the neutralizer agent used* | ○ *Formula : F002* |
| Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement | 10% |
| *Neutralizer agent added to the counting medium* | *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 **1%** de la formule **FC 913019** soumise à l'essai.

*Checking of the method and validation of the method by dilution neutralisation for the **1%** test concentration of the formula **FC 913019** 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* | *Nv* | *Nv 0* | *NvB* | *A* | *B* | *C* |
| **Candida albicans** | $1,5.10^7$ | $1,5.10^6$ | $3,3.10^2$ | $3,3.10^1$ | $3,5.10^4$ | $2,8.10^1$ | $3,1.10^1$ | $3,6.10^1$ |

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

N est compris entre 1,5 x $10^7$ UFC/ml et 5 x $10^7$ UFC/ml
*is comprised between 1.5 x $10^7$ CFU/ml and 5 x $10^7$ CFU/ml*

$N_0$ est compris entre 1,5 x $10^6$ UFC/ml et 5 x $10^6$ UFC/ml
*is comprised between 1.5 x $10^6$ CFU/ml and 5 x $10^6$ CFU/ml*

$N_V$ est compris entre 3 x $10^2$ UFC/ml et 1.6 x $10^3$ UFC/ml
*is comprised between 3 x $10^2$ CFU/ml and 1.6 x $10^3$ CFU/ml*

$N_{V0}$ est compris entre 3 x $10^1$ UFC/ml et 1.6 x $10^2$ UFC/ml
*is comprised between 3 x $10^1$ CFU/ml and 1.6 x $10^2$ CFU/ml*

$N_{vB}$ est compris entre 3 x $10^4$ UFC/ml et 1.6 x $10^5$ UFC/ml
*is comprised between 3 x $10^4$ CFU/ml and 1.6 x $10^5$ 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 **1%** de la formule **FC 913019** et pour la souche soumise à l'essai.

The neutralization is validated with the method by dilution neutralisation for the **1%** test concentration of the formula **FC 913019** 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) | | |
| | 0,01 | 0,1 | 1 |
| **Candida albicans** | $>3,3.10^4$ | $>3,3.10^4$ | $<1,4.10^2$ |

| | 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 | | |
| | 0,01 | 0,1 | 1 |
| **Candida albicans** | < 1,7 | < 1,7 | > 4,1 |

## 7. Conclusion (Conclusion)

Selon la norme NF EN 13624 (novembre 2013), la formule **FC 913019,** lorsqu'elle est diluée à la concentration de 1,00 **%** (m/v) dans de l'eau dure, présente une activité levuricide en **5 minutes** de contact à 20°C en conditions de saleté, vis-à-vis de la souche de référence : ***Candida albicans.***

*According to the European standard NF EN 13624 (november 2013), the formula* ***FC 913019*** *,when diluted at the concentration of* ***1,00%*** *(w/v) in hard water, presents a yeasticidal activity in a 5 minute contact time at 20°C in dirty conditions against the referenced strain :* ***Candida albicans.***

## 8. Annexe - Données expérimentales ( Experimental Data )

*Candida albicans - 5 minutes*

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

**Réf : FS311E**
**Date : 12/10/15**

Numéro d'identification: **4661 17 08 13624**
*Date :* **04.08.17**
Type de produit testé : Instrument
Méthode utilisée : Classique

Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC/boite | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Dilution -5 | Dilution -6 | Dilution -5 | Dilution -6 |
| Candida albicans DSM 1386 (équivalent ATCC 10231) | 149 | 15 | 149 | 15 |
| | 158 | 15 | 158 | 15 |
| | Lecture intermédiaire 20 à 24 heures | | Lecture 42 à 48 heures | |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boites considérées..... 337
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 : .....10 $^{5}$

Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d}$ = 1,5E+07 UFC/ml N0=N/10= 1,5E+06

$5 < Q = \frac{\bullet\ dil - 5 / 2}{\bullet\ dil - 6 / 2} < 15 = \frac{153,5}{15}$ = 10,2

**Essai de validation :** *Temps de contact :* NL 5'

| | | 14 à 330 UFC/boite | 14 à 330 UFC/boite |
|---|---|---|---|
| **Nv :** | témoin suspension | 38 | 38 |
| | | 27 | 27 |
| **NvB :** | témoin suspension B | 35 | 35 |
| | | 35 | 35 |
| **A :** | témoin des conditions expérimentales | 28 | 28 |
| | | 27 | 27 |
| **B :** | témoin de non-toxicité du neutralisant | 31 | 31 |
| | | 31 | 31 |
| **C :** | essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 1 % | 34 | 34 |
| | | 37 | 37 |
| | | Lecture intermédiaire 20 à 24 heures | Lecture 42 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

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

**Réf : FS311E**
**Date : 12/10/15**

Numéro d'identification: **4661 17 08 13624**

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Nv** | C $\frac{650}{2}$ | = | 3,3E+02 | $N_{v0=}$ 3,3E+01 | UFC/mL |
| **NvB** | C $\frac{70000}{2}$ | = | 3,5E+04 | | UFC/mL |
| **A** | C $\frac{55}{2}$ | = | 2,8E+01 | | UFC/mL |
| **B** | C $\frac{62}{2}$ | = | 3,1E+01 | | UFC/mL |
| **C** | C $\frac{71}{2}$ | = | 3,6E+01 | | UFC/mL |

Interprétation :

| | | | |
|---|---|---|---|
| N est compris entre 1,5.10 ^ 7 UFC/ml et 5.10 ^ 7 UFC/ml | 1,5E+07 | | Oui |
| Nv est compris entre 3.10 ^ 2 et 1,6.10 ^ 3 | 3,3E+02 | | Oui |
| NvB est compris entre 3.10$^{4}$ et 1,6.10$^{5}$ | 3,5E+04 | | Oui |
| Nv0 est compris entre 3.10$^{1}$ et 1,6.10$^{2}$ | 3,3E+01 | | Oui |
| A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 | 2,8E+01 | et 3,6E+01 | Oui |
| B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB | 3,1E+01 | | Oui |

**La neutralisation est validée :** Oui

**Essai :** *Temps de contact :* NL 5'

| Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | dilution au 1/100e de 1,25 | | Dilution au 1/10e de 1,25 | | 1,25 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Concentration produit %** | | **0,01** | | **0,1** | | **1** | | | |
| Lecture intermédiaire 20 à 24 heures de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | + | + | 2 | 6 | | |
| | -1 | + | + | + | + | 0 | 0 | | |
| | | | | | | | | | |
| Lecture 42 à 48 heures de 14 à 330 UFC par boîte | 0 | + | + | + | + | 2 | 6 | | |
| | -1 | + | + | + | + | 0 | 0 | | |
| | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Na = $\frac{C \times 10}{n}$ *x dilution* | > | 3,3E+04 | > | 3,3E+04 | < | 1,4E+02 | | | |
| **Log N0 = 6,2** | **Log Na =** | | 4,5 | | 4,5 | | 2,1 | | |
| Calcul de réduction = **Log $N_0$ - Log Na = Log R** | < | 1,7 | < | 1,7 | > | 4,1 | | | |

SUITE A DONNER :
VISA : Conforme

# Direction Scientifique

**Liste des signataires du document**

Nom_utilisateur : Chrystèle Pluchart
Titre : Responsable Laboratoire de Microbiologie
Date : jeudi, 21 septembre 2017, 15:59 Paris
Signification : Validation de document
==========

Nom_utilisateur : Gaetan Rauwel
Titre : Directeur Recherche et Développement
Date : jeudi, 21 septembre 2017, 17:23 Paris
Signification : Validation de document
==========

==========
N Demande : 35885
Rapport d'essai : A 17 126 13624

Etude : NF EN 13624

Date du document : 21/09/2017
==========

Laboratoires ANIOS
Laboratoire de microbiologie

cofrac ESSAIS
ACCREDITATION N°1-6419 PORTEE DISPONIBLE SUR WWW.COFRAC.FR

Sainghin en Mélantois, le 27 mars 2018
*Sainghin en Mélantois, on the March 27 th 2018*

Rapport d'essai : N° A 18 43 13624
*Test report : N° A 18 43 13624*

## 1. Objet de la demande *(Study Number)* n° 36772

Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide de la formule **FC 913019.** Méthode d'essai et prescriptions (phase 2 - étape 1) NF EN 13624 (Novembre 2013). Application aux désinfectants chimiques.
Indice de classement T 72-600.
Méthode par dilution neutralisation.
Essai partiel.

*Chemical antiseptics and disinfectants. Quantitative suspension test for the evaluation of the fungicidal activity of the formula **FC 913019.** Test method and prescriptions (phase 2 - step 1) according to NF EN 13624 (November 2013). Application to chemical disinfectants.*
*Classification index T 72-600.*

*Method by dilution neutralisation.*

*Partial test.*

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 *(Study Number)* n° 36772 1

2. Sommaire *(Summary)* 2

3. Introduction *(Introduction)* 3

4. Identification de l'échantillon *(Sample Identification)* 3

5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)* 4

   5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)* 4
   5.2. Méthode par dilution neutralisation *(Method by dilution neutralisation)* 4

6. Résultats *(Results)* 5

   6.1. Essais de validation des conditions expérimentales *(Validation tests)* 5
   6.2. Essais d'activité fongicide *(Evaluation of fungicidal activity)* 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 fongicide dans les conditions de laboratoire définies par la présente norme européenne ( essai partiel ).

*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 fungicidal activity in the laboratory conditions defined in the present European standard ( partial test ).*

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

| | |
|---|---|
| Code formule<br>*Code formula* | **FC 913019** |
| Numéro d'identification de l'échantillon<br>*Identification of the sample* | **0408 18 01 13624** |
| Numéro de lot<br>*Batch number* | **2446 FM 0410** |
| Fabricant<br>*Manufacturer* | **ECOLAB** |
| Date de réception au laboratoire<br>*Receipt date at the laboratory* | Le 31/07/17<br>*On the 31/07/17* |
| Conditions de stockage au laboratoire<br>*Storage conditions at the laboratory* | T° ambiante et obscurité<br>*Room temperature and darkness* |
| Substances actives<br>*Activ substances* | Solution à 20g/l : > 1000 ppm acide peracetique(CAS 79-21-0)<br>*Solution of 20g/l : > 1000 ppm peracetic acid (CAS 79-21-0)* |
| Période d'essai<br>*Period of analysis* | Du 22/01/18 au 02/02/18<br>*From 22/01/18 to 02/02/18* |

## 5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)*

### 5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)*

| | |
|---|---|
| Température de l'essai<br>*Test temperature* | 20°C ± 1°C |
| Temps de contact<br>*Contact Time* | **60 minutes** ± 10s |
| Diluant de la formule lors des essais<br>*Diluent of the formula used during the test* | Eau dure<br>*Hard water* |
| Apparence de la formule et de ses dilutions<br>*Appearance formula dilutions* | Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai<br>*Preparation physically homogeneous and stable during test* |
| Souche testée<br>*Tested strain* | ○ **Aspergillus brasiliensis ATCC 16404** |
| Pourcentage de spores échinulées<br>*Spiny spores percentage* | >75 %<br>*>75 %* |
| Substance interférente<br>*Interfering substance* | Albumine bovine à 0,3g/l<br>*0,3 g/l BSA* |
| Stabilité du mélange formule et substances interférentes<br>*Stability of the mixture (formula and interfering substance)* | Absence de précipité pendant l'essai<br>*Precipitate absent throughout the test* |
| Température d'incubation<br>*Incubation temperature* | 30°C ± 1°C<br>*30°C ± 1°C* |

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

| | |
|---|---|
| Nature du neutralisant utilisé<br>*Nature of the neutralizer agent used* | ○ Formule : F002<br>○ *Formula : F002* |
| Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement<br>*Neutralizer agent added to the counting medium* | 10%<br>*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 **1%** de la formule **FC 913019** soumise à l'essai.

*Checking of the method and validation of the method by dilution neutralisation for the **1%** test concentration of the formula **FC 913019** 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* | *Nv* | *Nv 0* | *NvB* | *A* | *B* | *C* |
| **Aspergillus brasiliensis** | $1{,}9.10^{7}$ | $1{,}9.10^{6}$ | $4{,}2.10^{2}$ | $4{,}2.10^{1}$ | $4{,}2.10^{4}$ | $4{,}2.10^{1}$ | $4{,}1.10^{1}$ | $4{,}3.10^{1}$ |

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

N est compris entre 1,5 x $10^7$ UFC/ml et 5 x $10^7$ UFC/ml
*is comprised between 1.5 x $10^7$ CFU/ml and 5 x $10^7$ CFU/ml*

$N_0$ est compris entre 1,5 x $10^6$ UFC/ml et 5 x $10^6$ UFC/ml
*is comprised between 1.5 x $10^6$ CFU/ml and 5 x $10^6$ CFU/ml*

$N_V$ est compris entre 3 x $10^2$ UFC/ml et 1.6 x $10^3$ UFC/ml
*is comprised between 3 x $10^2$ CFU/ml and 1.6 x $10^3$ CFU/ml*

$N_{V0}$ est compris entre 3 x $10^1$ UFC/ml et 1.6 x $10^2$ UFC/ml
*is comprised between 3 x $10^1$ CFU/ml and 1.6 x $10^2$ CFU/ml*

$N_{vB}$ est compris entre 3 x $10^4$ UFC/ml et 1.6 x $10^5$ UFC/ml
*is comprised between 3 x $10^4$ CFU/ml and 1.6 x $10^5$ 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 **1%** de la formule **FC 913019** et pour la souche soumise à l'essai.

The neutralization is validated with the method by dilution neutralisation for the **1%** test concentration of the formula **FC 913019** and for the tested strain.

## 6.2. Essais d'activité fongicide *(Evaluation of fungicidal 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) | | |
| | 0,1 | 0,5 | 1 |
| **Aspergillus brasiliensis** | $>1,7.10^4$ | $>1,7.10^4$ | $<1,4.10^2$ |

| | 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 | | |
| | 0,1 | 0,5 | 1 |
| **Aspergillus brasiliensis** | < 2,1 | < 2,1 | > 4,2 |

## 7. Conclusion (Conclusion)

Selon la norme NF EN 13624 (novembre 2013), la formule **FC 913019,** lorsqu'elle est diluée à la concentration de 1,00 **%** (m/v) dans de l'eau dure , présente une activité fongicide ( essai partiel ) en **60 minutes** de contact à 20°C en conditions de propreté , vis-à-vis de la souche de référence: ***Aspergillus brasiliensis.***

*According to the European standard NF EN 13624 (November 2013), the formula* ***FC 913019*** *,when diluted at the concentration of* ***1,00%*** *(w/v) in hard water, presents a fungicidal activity ( partial test ) in a 60 minute contact time at 20°C in clean conditions against the referenced strain :* ***Aspergillus brasiliensis.***

## 8. Annexe - Données expérimentales ( Experimental Data )

*Aspergillus brasiliensis - 60 minutes*

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

Réf : FS311F
Date : 27/11/17

Numéro d'identification: 0408 18 01 13624 — *Date :* 30.01.18
Type de produit testé : Autre
Méthode utilisée : Classique

Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 165 UFC/boîte | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Dilution -5 | | Dilution -6 | | Dilution -5 | | Dilution -6 | |
| Aspergillus brasiliensis ATCC 16404 | 84 | 99 | 15 | 12 | 84 | 99 | 15 | 12 |
| | 100 | 88 | 10 | 13 | 100 | 88 | 10 | 13 |
| | Lecture 42 à 48 heures | | | | Lecture 62 à 72 heures | | | |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boites considérées..... 421
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 : .....$10^{-5}$

Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0{,}1 \times n2) \times d}$ = 1,9E+07 UFC/ml N0=N/10= 1,9E+06

$5 < Q = \frac{\bullet\ dil - 5 / 2}{\bullet\ dil - 6 / 2} < 15 = \frac{185{,}5}{25}$ = 7,4

**Essai de validation :** *Temps de contact :* TL 60'

| | | 14 à 165 UFC/boîte | | 14 à 165 UFC/boîte | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Nv :** | témoin suspension | 17 | 20 | 17 | 20 |
| | | 24 | 22 | 24 | 22 |
| **NvB :** | témoin suspension B | 24 | 16 | 24 | 16 |
| | | 22 | 21 | 22 | 21 |
| **A :** | témoin des conditions expérimentales | 39 | | 39 | |
| | | 44 | | 44 | |
| **B :** | témoin de non-toxicité du neutralisant | 42 | | 42 | |
| | | 40 | | 40 | |
| **C :** | essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 1 % | 38 | | 38 | |
| | | 47 | | 47 | |
| | | Lecture 42 à 48 heures | | Lecture 62 à 72 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

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

Réf : FS311F
Date : 27/11/17

Numéro d'identification: 0408 18 01 13624

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Nv** | C $\frac{830}{2}$ | = | 4,2E+02 | $N_{v0=}$ 4,2E+01 | UFC/mL |
| **NvB** | C $\frac{83000}{2}$ | = | 4,2E+04 | | UFC/mL |
| **A** | C $\frac{83}{2}$ | = | 4,2E+01 | | UFC/mL |
| **B** | C $\frac{82}{2}$ | = | 4,1E+01 | | UFC/mL |
| **C** | C $\frac{85}{2}$ | = | 4,3E+01 | | UFC/mL |

Interprétation :

| | | | |
|---|---|---|---|
| N est compris entre 1,5.10 ^ 7 UFC/ml et 5.10 ^ 7 UFC/ml | 1,9E+07 | | Oui |
| Nv est compris entre 3.10 ^ 2 et 1,6.10 ^ 3 | 4,2E+02 | | Oui |
| NvB est compris entre $3.10^4$ et $1{,}6.10^5$ | 4,2E+04 | | Oui |
| Nv0 est compris entre $3.10^1$ et $1{,}6.10^2$ | 4,2E+01 | | Oui |
| A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 | 4,2E+01 | et 4,3E+01 | Oui |
| B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB | 4,1E+01 | | Oui |

**La neutralisation est validée :** Oui

**Essai :** *Temps de contact :* TL 60'

| Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | Dilution au 1/10 de fiole à 1,25% | | dilution au 1/2 de fiole à 1,25% | | 1,25 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Concentration produit %** | | **0,1** | | **0,5** | | **1** | | | |
| Lecture 42 à 48 heures de 14 à 165 UFC par boîte | 0 | + | + | + | + | 3 | 3 | | |
| | -1 | + | + | + | + | 0 | 0 | | |
| | | | | | | | | | |
| Lecture 62 à 72 heures de 14 à 165 UFC par boîte | 0 | + | + | + | + | 3 | 3 | | |
| | -1 | + | + | + | + | 0 | 0 | | |
| | | | | | | | | | |
| Na = $\frac{C \times 10}{n}$ x dilution | | > | 1,7E+04 | > | 1,7E+04 | < | 1,4E+02 | | |
| Log N0 = 6,3 | Log Na = | | 4,2 | | 4,2 | | 2,1 | | |
| Calcul de réduction = Log $N_0$ - Log Na = Log R | | < | 2,1 | < | 2,1 | > | 4,2 | | |

SUITE A DONNER :
VISA : Conforme

# Direction Scientifique

**Liste des signataires du document**

Nom_utilisateur : Chrystele Pluchart
Titre : Responsable Laboratoire de Microbiologie
Date : mardi, 03 avril 2018, 16:45 Paris
Signification : Validation de document
==========

Nom_utilisateur : Gaetan Rauwel
Titre : Directeur Recherche et Développement
Date : vendredi, 06 avril 2018, 09:03 Paris
Signification : Validation de document
==========

==========
N Demande : 36772
Rapport d'essai : A 18 43 13624

Etude : NF EN 13624

Date du document : 27/03/2018
==========

Laboratoires ANIOS
Laboratoire de microbiologie

cofrac ESSAIS
ACCREDITATION N°1-6419 PORTEE DISPONIBLE SUR WWW.COFRAC.FR

Sainghin en Mélantois, le 09 avril 2018
*Sainghin en Mélantois, on the April 09 th 2018*

Rapport d'essai : N° A 18 60 13624
*Test report : N° A 18 60 13624*

## 1. Objet de la demande *(Study Number)* n° 36828

Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide de la formule **FC 913019.** Méthode d'essai et prescriptions (phase 2 - étape 1) NF EN 13624 (Novembre 2013). Application aux désinfectants chimiques.
Indice de classement T 72-600.
Méthode par dilution neutralisation.
Essai partiel.

*Chemical antiseptics and disinfectants. Quantitative suspension test for the evaluation of the fungicidal activity of the formula **FC 913019.** Test method and prescriptions (phase 2 - step 1) according to NF EN 13624 (November 2013). Application to chemical disinfectants.*
*Classification index T 72-600.*

*Method by dilution neutralisation.*

*Partial test.*

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.*

**Laboratoires ANIOS SAS**
*Adresse : Pavé du moulin – 59260 Lille-Hellemmes*
*Tél. +33 3 20 67 67 67 – Fax : + 33 3 20 67 67 68*
*SIREN : 823 326 061 – SIRET : 823 326 061 00020*
*VAT : FR71823326061 – Capital Social : 773 630 132 euros*

## 2. Sommaire *(Summary)*


1. Objet de la demande *(Study Number)* n° 36828 1

2. Sommaire *(Summary)* 2

3. Introduction *(Introduction)* 3

4. Identification de l'échantillon *(Sample Identification)* 3

5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)* 4

5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)* 4
5.2. Méthode par dilution neutralisation *(Method by dilution neutralisation)* 4

6. Résultats *(Results)* 5

6.1. Essais de validation des conditions expérimentales *(Validation tests)* 5
6.2. Essais d'activité fongicide *(Evaluation of fungicidal activity)* 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 fongicide dans les conditions de laboratoire définies par la présente norme européenne ( essai partiel ).

*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 fungicidal activity in the laboratory conditions defined in the present European standard ( partial test ).*

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

| | |
|---|---|
| Code formule<br>*Code formula* | **FC 913019** |
| Numéro d'identification de l'échantillon<br>*Identification of the sample* | **2185 18 04 13624** |
| Numéro de lot<br>*Batch number* | **2446 FM 0410** |
| Fabricant<br>*Manufacturer* | **ECOLAB** |
| Date de réception au laboratoire | Le 31/07/17 |
| *Receipt date at the laboratory* | *On the 31/07/17* |
| Conditions de stockage au laboratoire | T° ambiante et obscurité |
| *Storage conditions at the laboratory* | *Room temperature and darkness* |
| Substances actives<br>*Activ substances* | Solution à 20g/l : > 1000 ppm<br>acide peracetique(CAS 79-21-0)<br>*Solution of 20g/l : > 1000 ppm*<br>*peracetic acid (CAS 79-21-0)* |
| Période d'essai | Du 04/04/18 au 09/04/18 |
| *Period of analysis* | *From 04/04/18 to 09/04/18* |

## 5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)*

### 5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)*

| | |
|---|---|
| Température de l'essai<br>*Test temperature* | 20°C ± 1°C |
| Temps de contact<br>*Contact Time* | **15 minutes** ± 10s |
| Diluant de la formule lors des essais<br>*Diluent of the formula used during the test* | Eau dure<br>*Hard water* |
| Apparence de la formule et de ses dilutions<br>*Appearance formula dilutions* | Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai<br>*Preparation physically homogeneous and stable during test* |
| Souche testée<br>*Tested strain* | ○ **Aspergillus brasiliensis ATCC 16404** |
| Pourcentage de spores échinulées<br>*Spiny spores percentage* | >75 %<br>*>75 %* |
| Substance interférente<br>*Interfering substance* | Albumine bovine à 0,3g/l<br>*0,3 g/l BSA* |
| Stabilité du mélange formule et substances interférentes<br>*Stability of the mixture (formula and interfering substance)* | Absence de précipité pendant l'essai<br>*Precipitate absent throughout the test* |
| Température d'incubation<br>*Incubation temperature* | 30°C ± 1°C<br>*30°C ± 1°C* |

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

| | |
|---|---|
| Nature du neutralisant utilisé<br>*Nature of the neutralizer agent used* | ○ Formule : F002<br>○ *Formula : F002* |
| Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement<br>*Neutralizer agent added to the counting medium* | 10%<br>*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 **2%** de la formule **FC 913019** soumise à l'essai.

*Checking of the method and validation of the method by dilution neutralisation for the **2%** test concentration of the formula **FC 913019** 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* | *Nv* | *Nv 0* | *NvB* | *A* | *B* | *C* |
| **Aspergillus brasiliensis** | $3{,}3.10^7$ | $3{,}3.10^6$ | $6{,}4.10^2$ | $6{,}4.10^1$ | $6{,}0.10^4$ | $6{,}0.10^1$ | $7{,}0.10^1$ | $5{,}4.10^1$ |

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

N est compris entre 1,5 x $10^7$ UFC/ml et 5 x $10^7$ UFC/ml
*is comprised between 1.5 x $10^7$ CFU/ml and 5 x $10^7$ CFU/ml*

$N_0$ est compris entre 1,5 x $10^6$ UFC/ml et 5 x $10^6$ UFC/ml
*is comprised between 1.5 x $10^6$ CFU/ml and 5 x $10^6$ CFU/ml*

$N_V$ est compris entre 3 x $10^2$ UFC/ml et 1.6 x $10^3$ UFC/ml
*is comprised between 3 x $10^2$ CFU/ml and 1.6 x $10^3$ CFU/ml*

$N_{V0}$ est compris entre 3 x $10^1$ UFC/ml et 1.6 x $10^2$ UFC/ml
*is comprised between 3 x $10^1$ CFU/ml and 1.6 x $10^2$ CFU/ml*

$N_{vB}$ est compris entre 3 x $10^4$ UFC/ml et 1.6 x $10^5$ UFC/ml
*is comprised between 3 x $10^4$ CFU/ml and 1.6 x $10^5$ 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 **2%** de la formule **FC 913019** et pour la souche soumise à l'essai.

The neutralization is validated with the method by dilution neutralisation for the **2%** test concentration of the formula **FC 913019** and for the tested strain.

## 6.2. Essais d'activité fongicide *(Evaluation of fungicidal 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) | | |
| | 0,5 | 1 | 2 |
| **Aspergillus brasiliensis** | $>1,7.10^4$ | $7,4.10^3$ | $<1,4.10^2$ |

| | 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 | | |
| | 0,5 | 1 | 2 |
| **Aspergillus brasiliensis** | < 2,3 | 2,6 | > 4,4 |

## 7. Conclusion (Conclusion)

Selon la norme NF EN 13624 (novembre 2013), la formule **FC 913019,** lorsqu'elle est diluée à la concentration de 2,00 **%** (v/v) dans de l'eau dure, présente une activité fongicide additionnelle ( essai partiel ) en **15 minutes** de contact à 20°C en conditions de propreté , vis-à-vis de la souche de référence : ***Aspergillus brasiliensis.***

*According to the European standard NF EN 13624 (November 2013), the formula* ***FC 913019*** *,when diluted at the concentration of* ***2,00%*** *(v/v) in hard water, presents an additional fungicidal activity ( partial test ) in a 15 minute contact time at 20°C in clean conditions against the referenced strain :* ***Aspergillus brasiliensis.***

## 8. Annexe - Données expérimentales ( Experimental Data )

*Aspergillus brasiliensis - 15 minutes*

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

Réf : FS311F
Date : 27/11/17

Numéro d'identification: 2185 18 04 13624
Date : 04.04.18
Type de produit testé : Autre
Méthode utilisée : Classique

Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 165 UFC/boîte | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Dilution -5 | | Dilution -6 | | Dilution -5 | | Dilution -6 | |
| Aspergillus brasiliensis ATCC 16404 | 196 | 174 | 13 | 18 | 196 | 174 | 13 | 18 |
| | 172 | 181 | 20 | 15 | 172 | 181 | 20 | 15 |
| | Lecture 42 à 48 heures | | | | Lecture 62 à 72 heures | | | |

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

Réf : FS311F
Date : 27/11/17

Numéro d'identification: 2185 18 04 13624

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Nv | C 1280 / 2 | = | 6,4E+02 | $N_{V0=}$ 6,4E+01 UFC/mL |
| NvB | C 120000 / 2 | = | 6,0E+04 | UFC/mL |
| A | C 119 / 2 | = | 6,0E+01 | UFC/mL |
| B | C 139 / 2 | = | 7,0E+01 | UFC/mL |
| C | C 108 / 2 | = | 5,4E+01 | UFC/mL |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boites considérées..... 66
n1 : nombre de boites prises en compte à la première dilution ..... 0
n2 : nombre de boites prises en compte à la deuxième dilution ..... 2
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte : .....$10^{-6}$

Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d}$ = 3,3E+07 UFC/ml N0=N/10= 3,3E+06

$5 < Q = \frac{\bullet\ dil - 5 / 2}{\bullet\ dil - 6 / 2} < 15 =$ ——— = Impossible

Interprétation :

| | | | |
|---|---|---|---|
| N est compris entre 1,5.10 ^ 7 UFC/ml et 5.10 ^ 7 UFC/ml | 3,3E+07 | | Oui |
| Nv est compris entre 3.10 ^ 2 et 1,6.10 ^ 3 | 6,4E+02 | | Oui |
| NvB est compris entre $3.10^4$ et $1,6.10^5$ | 6,0E+04 | | Oui |
| Nv0 est compris entre $3.10^1$ et $1,6.10^2$ | 6,4E+01 | | Oui |
| A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 | 6,0E+01 | et 5,4E+01 | Oui |
| B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB | 7,0E+01 | | Oui |

**La neutralisation est validée :** Oui

**Essai de validation :** *Temps de contact :* VL 15'

| | | 14 à 165 UFC/boîte | | 14 à 165 UFC/boîte | |
|---|---|---|---|---|---|
| Nv : | témoin suspension | 30 | 31 | 30 | 31 |
| | | 32 | 35 | 32 | 35 |
| NvB : | témoin suspension B | 26 | 32 | 26 | 32 |
| | | 34 | 28 | 34 | 28 |
| A : | témoin des conditions expérimentales | 64 | | 64 | |
| | | 55 | | 55 | |
| B : | témoin de non-toxicité du neutralisant | 78 | | 78 | |
| | | 61 | | 61 | |
| C : | essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 2 % | 52 | | 52 | |
| | | 56 | | 56 | |
| | | Lecture 42 à 48 heures | | Lecture 62 à 72 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

**Essai :** *Temps de contact :* VL 15'

| Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | dilution 1/2 de la fiole1,25% | | Pesée 1,25g | | Pesée 2,5g | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Concentration produit %** | | 0,5 | | 1 | | 2 | | | |
| Lecture 42 à 48 heures de 14 à 165 UFC par boîte | 0 | + | + | + | + | 0 | 0 | | |
| | -1 | + | + | 68 | 79 | 0 | 0 | | |
| | | | | | | | | | |
| Lecture 62 à 72 heures de 14 à 165 UFC par boîte | 0 | + | + | + | + | 0 | 0 | | |
| | -1 | + | + | 68 | 79 | 0 | 0 | | |
| | | | | | | | | | |

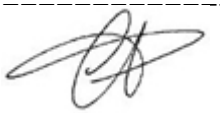
| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Na = $\frac{C \times 10}{n}$ x dilution | > | 1,7E+04 | | 7,4E+03 | < | 1,4E+02 | | |
| Log N0 = 6,5 | Log Na = | | 4,2 | | 3,9 | | 2,1 | |
| Calcul de réduction = Log $N_0$ - Log Na = Log R | | < | 2,3 | | 2,6 | > | 4,4 | |

SUITE A DONNER :
VISA : Conforme

# Direction Scientifique

**Liste des signataires du document**

Nom_utilisateur : Gaetan Rauwel
Titre : Directeur Recherche et Développement
Date : lundi, 09 avril 2018, 09:00 Paris
Signification : Validation de document
==========



Nom_utilisateur : Chrystele Pluchart
Titre : Responsable Laboratoire de Microbiologie
Date : lundi, 09 avril 2018, 10:14 Paris
Signification : Validation de document
==========

==========
N Demande : 36828
Rapport d'essai : A 18 60 13624

Etude : NF EN 13624

Date du document : 09/04/2018
==========

Laboratoires ANIOS
Laboratoire de microbiologie

cofrac ESSAIS
ACCREDITATION N°1-6419 PORTEE DISPONIBLE SUR WWW.COFRAC.FR

Sainghin en Mélantois, le 21 septembre 2017
*Sainghin en Mélantois, on the September 21th 2017*

Rapport d'essai : N° A 17 127 13697
*Test report : N° A 17 127 13697*

## 1. Objet de la demande *(Study Number)* n° 35886

Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de surface non poreuse pour l'évaluation de l'activité bactéricide de la formule **FC 913019.** Méthode d'essai sans action mécanique et prescriptions (phase 2/étape 2) selon NF EN 13697- (juin 2015). Essai quantitatif de surface pour l'évaluation de l'activité bactéricide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité.
Indice de classement T 72-193.
Méthode par dilution neutralisation.

Antiseptics and chemical disinfectants. Quantitative carrier test for the evaluation of bactericidal activity of the formula ***FC 913019.*** Test method without mechanical action and requirements (phase 2 -step 2) according to the NF EN 13697 ( June 2015). Quantitative carrier test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas.
*Classification index T 72 – 193*
*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.*

**Laboratoires ANIOS SAS**
*Adresse : Pavé du moulin – 59260 Lille-Hellemmes*
*Tél. +33 3 20 67 67 67 – Fax : + 33 3 20 67 67 68*
*SIREN : 823 326 061 – SIRET : 823 326 061 00020*
*VAT : FR71823326061 – Capital Social : 773 630 132 euros*

## 2. Sommaire *(Summary)*


1. Objet de la demande *(Study Number)* n° 35886 1

2. Sommaire *(Summary)* 2

3. Introduction *(Introduction)* 3

4. Identification de l'échantillon *(Sample Identification)* 3

5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)* 4

   5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)* 4
   5.2. Méthode par dilution neutralisation *(Method by dilution neutralisation)* 4

6. Résultats *(Results)* 5

   6.1. Essais de validation des conditions expérimentales *(Validation tests)* 5
   6.2. Essais d'activité bactéricide *(Evaluation of bactericidal activity)* 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 de surfaces décrite dans la norme européenne NF EN 13697 « *Antiseptiques et désinfectants chimiques* essai quantitatif de surface pour l'évaluation de l'activité bactéricide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité - phase 2 étape 2 ».

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 13697 "Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative carrier test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas - Phase 2 Step 2 " .*

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

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

| | |
|---|---|
| Code formule<br>*Code formula* | **FC 913019** |
| Numéro d'identification de l'échantillon<br>*Identification of the sample* | **4572 17 08 13697** |
| Numéro de lot<br>*Batch number* | **2446FM0410** |
| Fabricant<br>*Manufacturer* | **ECOLAB** |
| Date de réception au laboratoire<br>*Receipt date at the laboratory* | Le 31/07/17<br>*On the 31/07/17* |
| Conditions de stockage au laboratoire<br>*Storage conditions at the laboratory* | T° ambiante et obscurité<br>*Room temperature and darkness* |
| Substances actives<br>*Activ substances* | Solution à 20g/l : > 1000 ppm acide peracetique(CAS 79-21-0)<br>*Solution of 20g/l : > 1000 ppm peracetic acid (CAS 79-21-0)* |
| Période d'essai<br>*Period of analysis* | Du 01/08/17 au 03/08/17<br>*From 01/08/17 to 03/08/17* |

## 5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)*

### 5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)*

| | |
|---|---|
| Température de l'essai<br>*Test temperature* | 18 à 25°C ± 1°C |
| Temps de contact<br>*Contact Time* | **5 minutes** ± 10s |
| Nature du support<br>*Nature of the carrier* | Inox<br>*Stainless Steel* |
| Diluant de la formule lors des essais<br>*Diluent of the formula used during the test* | Eau dure<br>*Hard water* |
| Apparence de la formule et de ses dilutions<br>*Appearance formula dilutions* | Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai<br>*Preparation physically homogeneous and stable during test* |
| Souches testées<br>*Tested strains* | ○ **Pseudomonas aeruginosa CIP 103467 (équivalent ATCC 15442)**<br>○ **Escherichia coli CIP 54127 (équivalent ATCC 10536)**<br>○ **Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC 10541)**<br>○ **Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent ATCC 6538)** |
| Substance interférente<br>*Interfering substance* | Albumine bovine à 3g/l<br>*3 g/l BSA* |
| Stabilité du mélange formule et substances interférentes<br>*Stability of the mixture (formula and interfering substance)* | Absence de précipité pendant l'essai<br>*Precipitate absent throughout the test* |
| Température d'incubation<br>*Incubation temperature* | 37°C ± 1°C<br>*37°C ± 1°C* |

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

| | |
|---|---|
| Nature du neutralisant utilisé<br>*Nature of the neutralizer agent used* | ○ Formule : F002<br>○ *Formula : F002* |
| Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement<br>*Neutralizer agent added to the counting medium* | ø<br>ø |

## 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 **1%** de la formule **FC 913019** soumise à l'essai.

*Checking of the method and validation of the method by dilution neutralisation for the **1%** test concentration of the formula **FC 913019** to be tested.*

| | Nombre de cellules viables (UFC/ml) *(Number of viable cells(CFU/ml))* | | | |
|---|---|---|---|---|
| Souches testées | Suspension d'essai | Validation des conditions expérimentales | Non Toxicité du neutralisant | Validation de la méthode |
| *Tested strains* | *Test suspension* | *Experimental conditions control* | *Neutralizer toxicity control* | *Method validation* |
| | *N* | *Nc* | *NC* | *NT* |
| **Pseudomonas aeruginosa CIP 103467 (équivalent** | 6,57 | 6,48 | 6,45 | 6,46 |
| **Escherichia coli CIP 54127 (équivalent ATCC 10536)** | 6,60 | 6,46 | 6,49 | 6,43 |
| **Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC 10541)** | 6,86 | 6,86 | 6,69 | 6,72 |
| **Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent ATCC** | 6,86 | 6,86 | 6,74 | 6,85 |

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

N = Log d'UFC pour 0.05 ml de suspension d'essai - *Log FCU for 0.05 ml of test suspension*
Nc =Log d'UFC / surface d'essai pour le témoin eau – *Log FCU / surface test for water control*
NC = Log d'UFC par surface d'essai du témoin neutralisant - *Log FCU / surface test for neutralizer control*
NT = Log d'UFC par surface d'essai du témoin de neutralisation - *Log FCU / surface test for neutralization control*

N est $\geq$ à 6.57 $\log_{10}$ et $\leq$ à 7.10 $\log_{10}$
*Is $\geq$ at 6.57 $\log_{10}$ and $\leq$ at 7.10 $\log_{10}$*

Nc est $\geq$ 6.27 $\log_{10}$ - *Nc is $\geq$ at 6.27 $\log_{10}$*

NC est > à 0.5 Nc - *NC is > at 0.5 Nc*

NT est > à 0.5 Nc et n'est pas supérieur à ± 0.3 - *NT is > at 0.5 Nc and is not higher than ± 0.3*

La neutralisation est validée avec la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **1%** de la formule **FC 913019** et pour les souches soumises à l'essai.

The neutralization is validated with the method by dilution neutralisation for the **1%** test concentration of the formula **FC 913019** and for the tested strains.

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

| Souches testées | Nombre d'UFC par surface d'essai pour le mélange d'essai (Nd) pour les concentrations de : %(v/v) | | |
|---|---|---|---|
| Tested strains | Number of CFU by test surface for the test mixture (Nd) for the concentrations of : %(v/v) | | |
| | 0,01 | 0,1 | 1 |
| **Pseudomonas aeruginosa CIP 103467** | 3,88 | <2,15 | <0,10 |
| **Escherichia coli CIP 54127 (équivalent** | 4,97 | <0,10 | <0,10 |
| **Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC** | >5,52 | <0,10 | <0,10 |
| **Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent** | >5,52 | 2,18 | <0,10 |

| Souches testées | R = Réduction Logarithmique R = Nc - Nd | | |
|---|---|---|---|
| Tested strains | R = Logarithmic reduction R = Nc - Nd | | |
| | 0,01 | 0,1 | 1 |
| **Pseudomonas aeruginosa CIP 103467** | 2,60 | > 4,33 | > 6,38 |
| **Escherichia coli CIP 54127 (équivalent** | 1,49 | > 6,36 | > 6,36 |
| **Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC** | < 1,34 | > 6,76 | > 6,76 |
| **Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent** | < 1,34 | 4,68 | > 6,76 |

## 7. Conclusion (Conclusion)

Selon la norme NF EN 13697 (Juin 2015), la formule **FC 913019,** lorsqu'elle est diluée à la concentration de 0,10 **%** (m/v) dans de l'eau dure, présente une activité bactéricide en **5 minutes** de contact en conditions de saleté, vis-à-vis des souches de référence : ***Pseudomonas aeruginosa CIP 103467 , Escherichia coli CIP 54127 ,Enterococcus hirae CIP 5855, Staphylococcus aureus CIP 483 .***

According to the European standard NF EN 13697 (June 2015), the formula ***FC 913019*** *,when diluted at the concentration of* ***0,10%*** *(w/v) in hard water, presents a bactericidal activity in a 5 minute contact time in dirty conditions against the referenced strains :* ***Pseudomonas aeruginosa CIP 103467 , Escherichia coli CIP 54127 , Enterococcus hirae CIP 5855 ,Staphylococcus aureus CIP 483 .***

## 8. Annexe - Données expérimentales ( Experimental Data )

*Pseudomonas aeruginosa CIP 103467 (équivalent ATCC 15442) - 5 minutes*

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
Norme NF EN 13697 (bactericidie) *Juin 2015*

**Réf : FS124Q**
**Date: 05/10/15**

*Numéro d'identification:* 4572 17 08 13697 *Date :* 01.08.17

**Dénombrement de la suspension bactérienne:**

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 colonies/boite | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Dilution - 6 | Dilution - 7 | Dilution - 6 | Dilution - 7 |
| Pseudomonas aeruginosa CIP 103467 (équivalent ATCC 15442) | 141<br>150 | 15<br>18 | 141<br>150 | 15<br>18 |
| | Lecture à 24 heures | | Lecture à 48 heures | |

| | |
|---|---|
| c : somme des valeurs de Vc prises en compte | 324 |
| n1 : nombre de valeurs de Vc prises en compte dans la plus faible dilution | 2 |
| n2 : nombre de valeurs de Vc prises en compte dans la plus forte dilution | 2 |
| d : taux de dilution de la plus faible dilution | - 6 |

Moyenne pondérée : $N = \log \frac{0{,}025 \times c}{(n1 + 0{,}1n2) \times d} = 6{,}57$ Q = 8,8

**Essai de validation :** *Temps de contact :* KP 5'

| | | -3 | -4 | -5 | -6 | Nts | Nc; NT; NC = $\log \frac{c \times 10}{n \times d}$ ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| c | 24h | 294<br>301 | 33<br>35 | 5<br>3 | 0<br>0 | 15 | Nc = log ( 663 ) /2,2 × 10/10 $^{-3}$ = 6,48 |
| | 48h | 294<br>301 | 33<br>35 | 5<br>3 | 0<br>0 | 15 | Nc • 6,27 logs<br>Conforme |
| C | 24h | 271<br>283 | 26<br>29 | 4<br>1 | | | NC = log ( 609 ) /2,2 × 10/10 $^{-3}$ = 6,45 |
| | 48h | 271<br>283 | 26<br>29 | 4<br>1 | | | NC > 0,5 Nc<br>Conforme |
| T | 24h | 275<br>288 | 37<br>28 | 2<br>6 | | | NT = log ( 628 ) /2,2 × 10/10 $^{-3}$ = 6,46 |
| 1 % | 48h | 275<br>288 | 37<br>28 | 2<br>6 | | | NT > 0,5 Nc<br>Conforme |

Nc : logarithme du nombre d'UFC par surface d'essai pour le témoin eau
NC : logarithme du nombre d'UFC par surface d'essai du témoin neutralisation
NT : logarithme du nombre d'UFC apr surface d'essai du neutralisant
c : somme des valeurs de Vc prises en compte
n : nombre de valeurs de Vc prises en compte
d : dilution prise en compte
Nts : nombre de microorganismes restant sur le support

La neutralisation est validée: Oui

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
Norme NF EN 13697 (bactericidie) *Juin 2015*

**Réf : FS124Q**
**Date : 05/10/15**

*Numéro d'identification:* 4572 17 08 13697

**Essai proprement dit :** *Temps de contact :* KP 5'

| Volume pipeté de produit pour fiole 100mL (mL) | Concentrations (%) | | 0 | -1 | -2 | Nts | Nd = log (( m + m' + n + n' ) / 2,2 × V x d |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,01 | 0,01 | 24h | + + | 76 73 | 7 8 | 0 | Nd = log ( 149 ) /2 × 10/10 $^{-1}$ = 3,88 |
| | | 48h | + + | 76 73 | 7 8 | 0 | |
| 0,1 | 0,1 | 24h | 10 6 | 0 0 | 0 0 | 0 | Nd = log ( 28 ) /2 × 10/10 $^{0}$ = < 2,15 |
| | | 48h | 10 6 | 0 0 | 0 0 | 0 | |
| 1 | 1 | 24h | 1 0 | 0 0 | 0 0 | 0 | Nd = log ( 28 ) /2 × 10/10 $^{0}$ = < 0,10 |
| | | 48h | 1 0 | 0 0 | 0 0 | 0 | |
| | | 24h | | | | | = |
| | | 48h | | | | | |

m, m' : réplicats de la plus faible dilution, exprimés en UFC
n, n' : réplicats de la plus faible dilution, exprimés en UFC
V : volume inoculé dans la boîte, exprimés en ml
d : taux de dilution le plus faible

**Calcul de réduction :**

| Concentrations | R = Nc - Nd | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,01 | R = | 6,48 | - | 3,88 | = 2,60 |
| 0,1 | R = | 6,48 | - | < 2,15 | = > 4,33 |
| 1 | R = | 6,48 | - | < 0,10 | = > 6,38 |
| | R = | | - | | = |

Activité bactéricide : Réduction logarithmique • 4
VISA : Conforme
SUITE A DONNER :

## *Escherichia coli CIP 54127 (équivalent ATCC 10536) - 5 minutes*

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
Norme NF EN 13697 (bactericidie) *Juin 2015*

**Réf : FS124Q**
**Date: 05/10/15**

*Numéro d'identification:* 4572 17 08 13697 *Date :* 01.08.17

**Dénombrement de la suspension bactérienne:**

| | Dénombrement : 14 à 330 colonies/boite | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Souche** | **Dilution - 6** | **Dilution - 7** | **Dilution - 6** | **Dilution - 7** |
| Escherichia coli CIP 54127 (équivalent ATCC 10536) | 156<br>162 | 16<br>13 | 156<br>162 | 16<br>13 |
| | **Lecture à 24 heures** | | **Lecture à 48 heures** | |

| | |
|---|---|
| c : somme des valeurs de Vc prises en compte | 334 |
| n1 : nombre de valeurs de Vc prises en compte dans la plus faible dilution | 2 |
| n2 : nombre de valeurs de Vc prises en compte dans la plus forte dilution | 1 |
| d : taux de dilution de la plus faible dilution | - 6 |

Moyenne pondérée : $N = \log \frac{0{,}025 \times c}{(n1 + 0{,}1n2) \times d} = 6{,}60$ Q = 10,6

**Essai de validation :** *Temps de contact :* KP 5'

| | | -3 | -4 | -5 | -6 | Nts | Nc; NT; NC = $\log \frac{c \times 10}{n \times d}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| c | 24h | 286<br>291 | 30<br>26 | 2<br>1 | 0<br>0 | 3 | Nc = log ( 633 ) /2,2 × 10/10 $^{-3}$ = 6,46 |
| | 48h | 286<br>291 | 30<br>26 | 2<br>1 | 0<br>0 | 3 | Nc • 6,27 logs<br>Conforme |
| C | 24h | 303<br>320 | 28<br>35 | 4<br>2 | | | NC = log ( 686 ) /2,2 × 10/10 $^{-3}$ = 6,49 |
| | 48h | 303<br>320 | 28<br>35 | 4<br>2 | | | NC > 0,5 Nc<br>Conforme |
| T | 24h | 271<br>282 | 26<br>21 | 4<br>1 | | | NT = log ( 600 ) /2,2 × 10/10 $^{-3}$ = 6,43 |
| 1 % | 48h | 271<br>282 | 26<br>21 | 4<br>1 | | | NT > 0,5 Nc<br>Conforme |

Nc : logarithme du nombre d'UFC par surface d'essai pour le témoin eau
NC : logarithme du nombre d'UFC par surface d'essai du témoin neutralisation
NT : logarithme du nombre d'UFC apr surface d'essai du neutralisant
c : somme des valeurs de Vc prises en compte
n : nombre de valeurs de Vc prises en compte
d : dilution prise en compte
Nts : nombre de microorganismes restant sur le support

La neutralisation est validée: Oui

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
Norme NF EN 13697 (bactericidie) *Juin 2015*

**Réf : FS124Q**
**Date : 05/10/15**

*Numéro d'identification:* 4572 17 08 13697

**Essai proprement dit :** *Temps de contact :* KP 5'

| Volume pipeté de produit pour fiole 100mL (mL) | Concentrations (%) | | 0 | -1 | -2 | Nts | Nd = log (( m + m' + n + n' ) / 2,2 × V x d |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,01 | 0,01 | 24h | +<br>+ | +<br>+ | 92<br>96 | 2 | Nd = log ( 188 ) /2 × 10/10 $^{-2}$ = 4,97 |
| | | 48h | +<br>+ | +<br>+ | 92<br>96 | 2 | |
| 0,1 | 0,1 | 24h | 0<br>0 | 0<br>0 | 0<br>0 | 0 | Nd = log ( 28 ) /2 × 10/10 $^{0}$ = < 0,10 |
| | | 48h | 0<br>0 | 0<br>0 | 0<br>0 | 0 | |
| 1 | 1 | 24h | 0<br>0 | 0<br>0 | 0<br>0 | 0 | Nd = log ( 28 ) /2 × 10/10 $^{0}$ = < 0,10 |
| | | 48h | 0<br>0 | 0<br>0 | 0<br>0 | 0 | |
| | | 24h | | | | | = |
| | | 48h | | | | | |

m, m' : réplicats de la plus faible dilution, exprimés en UFC
n, n' : réplicats de la plus faible dilution, exprimés en UFC
V : volume inoculé dans la boîte, exprimés en ml
d : taux de dilution le plus faible

**Calcul de réduction :**

| Concentrations | R = Nc - Nd |
|---|---|
| 0,01 | R = 6,46 - 4,97 = 1,49 |
| 0,1 | R = 6,46 - < 0,10 = > 6,36 |
| 1 | R = 6,46 - < 0,10 = > 6,36 |
| | R = - = |

Activité bactéricide : Réduction logarithmique • 4
VISA : Conforme
SUITE A DONNER :

# *Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC 10541) - 5 minutes*

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
Norme NF EN 13697 (bactericidie) *Juin 2015*

**Réf : FS124Q**
**Date: 05/10/15**

*Numéro d'identification:* 4572 17 08 13697 *Date :* 01.08.17

**Dénombrement de la suspension bactérienne:**

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 colonies/boite | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Dilution - 6 | Dilution - 7 | Dilution - 6 | Dilution - 7 |
| Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC 10541) | 282 | 26 | 282 | 26 |
| | 299 | 27 | 299 | 27 |
| | Lecture à 24 heures | | Lecture à 48 heures | |

c : somme des valeurs de Vc prises en compte 634
n1 : nombre de valeurs de Vc prises en compte dans la plus faible dilution 2
n2 : nombre de valeurs de Vc prises en compte dans la plus forte dilution 2
d : taux de dilution de la plus faible dilution - 6

Moyenne pondérée : $N = \log \frac{0{,}025 \times c}{(n1 + 0{,}1n2) \times d} = 6{,}86$ Q = 11,0

**Essai de validation :** *Temps de contact :* KP 5'

| | | -3 | -4 | -5 | -6 | Nts | Nc; NT; NC = $\log(\frac{c \times 10}{n \times d})$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| c | 24h | + | 70 | 8 | 1 | 21 | Nc = log ( 143 ) /2 × 10/10 $^{-4}$ = 6,86 |
| | | + | 73 | 11 | 0 | | |
| | 48h | + | 70 | 8 | 1 | 21 | Nc • 6,27 logs |
| | | + | 73 | 11 | 0 | | Conforme |
| C | 24h | + | 50 | 7 | | | NC = log ( 97 ) /2 × 10/10 $^{-4}$ = 6,69 |
| | | + | 47 | 8 | | | |
| | 48h | + | 50 | 7 | | | NC > 0,5 Nc |
| | | + | 47 | 8 | | | Conforme |
| T | 24h | + | 53 | 4 | | | NT = log ( 106 ) /2 × 10/10 $^{-4}$ = 6,72 |
| | | + | 53 | 4 | | | |
| 1 % | 48h | + | 53 | 4 | | | NT > 0,5 Nc |
| | | + | 53 | 4 | | | Conforme |

Nc : logarithme du nombre d'UFC par surface d'essai pour le témoin eau
NC : logarithme du nombre d'UFC par surface d'essai du témoin neutralisation
NT : logarithme du nombre d'UFC apr surface d'essai du neutralisant
c : somme des valeurs de Vc prises en compte
n : nombre de valeurs de Vc prises en compte
d : dilution prise en compte
Nts : nombre de microorganismes restant sur le support

La neutralisation est validée: Oui

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
Norme NF EN 13697 (bactericidie) *Juin 2015*

**Réf : FS124Q**
**Date : 05/10/15**

*Numéro d'identification:* 4572 17 08 13697

**Essai proprement dit :** *Temps de contact :* KP 5'

| Volume pipeté de produit pour fiole 100mL (mL) | Concentrations (%) | | 0 | -1 | -2 | Nts | Nd = log (( m + m' + n + n' ) / 2,2 × V x d |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,01 | 0,01 | 24h | + + | + + | + + | 27 | Nd = log ( 660 ) /2 × 10/10 $^{-2}$ = > 5,52 |
| | | 48h | + + | + + | + + | 27 | |
| 0,1 | 0,1 | 24h | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 | Nd = log ( 28 ) /2 × 10/10 $^{0}$ = < 0,10 |
| | | 48h | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 | |
| 1 | 1 | 24h | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 | Nd = log ( 28 ) /2 × 10/10 $^{0}$ = < 0,10 |
| | | 48h | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 | |
| | | 24h | | | | | = |
| | | 48h | | | | | |

m, m' : réplicats de la plus faible dilution, exprimés en UFC
n, n' : réplicats de la plus faible dilution, exprimés en UFC
V : volume inoculé dans la boîte, exprimés en ml
d : taux de dilution le plus faible

**Calcul de réduction :**

| Concentrations | R = Nc - Nd |
|---|---|
| 0,01 | R = 6,86 - > 5,52 = < 1,34 |
| 0,1 | R = 6,86 - < 0,10 = > 6,76 |
| 1 | R = 6,86 - < 0,10 = > 6,76 |
| | R = - = |

Activité bactéricide : Réduction logarithmique• 4
VISA : Conforme
SUITE A DONNER :

*Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent ATCC 6538) - 5 minutes*

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
Norme NF EN 13697 (bactericidie) *Juin 2015*

**Réf : FS124Q**
**Date: 05/10/15**

*Numéro d'identification:* 4572 17 08 13697 *Date :* 01.08.17

**Dénombrement de la suspension bactérienne:**

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 colonies/boite | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Dilution - 6 | Dilution - 7 | Dilution - 6 | Dilution - 7 |
| Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent ATCC 6538) | 287 | 23 | 287 | 23 |
| | 304 | 28 | 304 | 28 |
| | Lecture à 24 heures | | Lecture à 48 heures | |

c : somme des valeurs de Vc prises en compte 642
n1 : nombre de valeurs de Vc prises en compte dans la plus faible dilution 2
n2 : nombre de valeurs de Vc prises en compte dans la plus forte dilution 2
d : taux de dilution de la plus faible dilution - 6

Moyenne pondérée : $N = \log \frac{0{,}025 \times c}{(n1 + 0{,}1n2) \times d} = 6{,}86$ Q = 11,6

**Essai de validation :** *Temps de contact :* KP 5'

| | | -3 | -4 | -5 | -6 | Nts | Nc; NT; NC = $\log(\frac{c \times 10}{n \times d})$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| c | 24h | + | 66 | 5 | 1 | 28 | Nc = log ( 143 ) /2 × 10/10 $^{-4}$ = 6,86 |
| | | + | 77 | 9 | 0 | | |
| | 48h | + | 66 | 5 | 1 | 28 | Nc • 6,27 logs |
| | | + | 77 | 9 | 0 | | Conforme |
| C | 24h | + | 56 | 6 | | | NC = log ( 109 ) /2 × 10/10 $^{-4}$ = 6,74 |
| | | + | 53 | 5 | | | |
| | 48h | + | 56 | 6 | | | NC > 0,5 Nc |
| | | + | 53 | 5 | | | Conforme |
| T | 24h | + | 68 | 10 | | | NT = log ( 139 ) /2 × 10/10 $^{-4}$ = 6,85 |
| | | + | 71 | 9 | | | |
| 1 % | 48h | + | 68 | 10 | | | NT > 0,5 Nc |
| | | + | 71 | 9 | | | Conforme |

Nc : logarithme du nombre d'UFC par surface d'essai pour le témoin eau
NC : logarithme du nombre d'UFC par surface d'essai du témoin neutralisation
NT : logarithme du nombre d'UFC apr surface d'essai du neutralisant
c : somme des valeurs de Vc prises en compte
n : nombre de valeurs de Vc prises en compte
d : dilution prise en compte
Nts : nombre de microorganismes restant sur le support

La neutralisation est validée: Oui

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
Norme NF EN 13697 (bactericidie) *Juin 2015*

**Réf : FS124Q**
**Date : 05/10/15**

*Numéro d'identification:* 4572 17 08 13697

**Essai proprement dit :** *Temps de contact :* KP 5'

| Volume pipeté de produit pour fiole 100mL (mL) | Concentrations (%) | | 0 | -1 | -2 | Nts | Nd = log (( m + m' + n + n' ) / 2,2 × V x d |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,01 | 0,01 | 24h | + | + | + | 49 | Nd = log ( 660 ) /2 × 10/10 $^{-2}$ = > 5,52 |
| | | | + | + | + | | |
| | | 48h | + | + | + | 49 | |
| | | | + | + | + | | |
| 0,1 | 0,1 | 24h | 10 | 0 | 0 | 0 | Nd = log ( 15 ) /1 × 10/10 $^{0}$ = 2,18 |
| | | | 15 | 1 | 0 | | |
| | | 48h | 10 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 15 | 1 | 0 | | |
| 1 | 1 | 24h | 0 | 0 | 0 | 0 | Nd = log ( 28 ) /2 × 10/10 $^{0}$ = < 0,10 |
| | | | 0 | 0 | 0 | | |
| | | 48h | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 0 | 0 | 0 | | |
| | | 24h | | | | | = |
| | | 48h | | | | | |

m, m' : réplicats de la plus faible dilution, exprimés en UFC
n, n' : réplicats de la plus faible dilution, exprimés en UFC
V : volume inoculé dans la boîte, exprimés en ml
d : taux de dilution le plus faible

**Calcul de réduction :**

| Concentrations | R = Nc - Nd |
|---|---|
| 0,01 | R = 6,86 - > 5,52 = < 1,34 |
| 0,1 | R = 6,86 - 2,18 = 4,68 |
| 1 | R = 6,86 - < 0,10 = > 6,76 |
| | R = - = |

Activité bactéricide : Réduction logarithmique • 4
VISA : Conforme
SUITE A DONNER :

# Direction Scientifique

**Liste des signataires du document**

Nom_utilisateur : Chrystèle Pluchart
Titre : Responsable Laboratoire de Microbiologie
Date : jeudi, 21 septembre 2017, 15:27 Paris
Signification : Validation de document
==========

Nom_utilisateur : Gaetan Rauwel
Titre : Directeur Recherche et Développement
Date : jeudi, 21 septembre 2017, 17:32 Paris
Signification : Validation de document
==========

==========
N Demande : 35886
Rapport d'essai : A 17 127 13697

Etude : NF EN 13697 bactéricide

Date du document : 07/08/2017
==========

Laboratoires ANIOS
Laboratoire de microbiologie

cofrac ESSAIS
ACCREDITATION N°1-6419 PORTEE DISPONIBLE SUR WWW.COFRAC.FR

Sainghin en Mélantois, le 21 septembre 2017
*Sainghin en Mélantois, on the September 21 th 2017*

Rapport d'essai : N° A 17 166 13697
*Test report : N° A 17 166 13697*

## 1. Objet de la demande *(Study Number)* n° 35956

Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de surface non poreuse pour l'évaluation de l'activité levuricide de la formule **FC 913019.** Méthode d'essai sans action mécanique et prescriptions (phase 2/étape 2) selon NF EN 13697- (juin 2015). Essai quantitatif de surface pour l'évaluation de l'activité levuricide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité.
Indice de classement T 72-193.
Méthode par dilution neutralisation.

Antiseptics and chemical disinfectants. Quantitative carrier test for the evaluation of *yeasticidal* activity of the formula ***FC 913019.*** Test method without mechanical action and requirements (phase 2 -step 2) according to the NF EN 13697 ( June 2015). Quantitative carrier test for the evaluation of *yeasticidal* activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas.
*Classification index T 72 – 193*
*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.*

**Laboratoires ANIOS SAS**
*Adresse : Pavé du moulin – 59260 Lille-Hellemmes*
*Tél. +33 3 20 67 67 67 – Fax : + 33 3 20 67 67 68*
*SIREN : 823 326 061 – SIRET : 823 326 061 00020*
*VAT : FR71823326061 – Capital Social : 773 630 132 euros*

## 2. Sommaire *(Summary)*


1. Objet de la demande *(Study Number)* n° 35956 1

2. Sommaire *(Summary)* 2

3. Introduction *(Introduction)* 3

4. Identification de l'échantillon *(Sample Identification)* 3

5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)* 4

   5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)* 4
   5.2. Méthode par dilution neutralisation *(Method by dilution neutralisation)* 4

6. Résultats *(Results)* 5

   6.1. Essais de validation des conditions expérimentales *(Validation tests)* 5
   6.2. Essais d'activité levuricide *(Evaluation of yeasticidal activity)* 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 de surfaces décrite dans la norme européenne NF EN 13697 « *Antiseptiques et désinfectants chimiques* essai quantitatif de surface pour l'évaluation de l'activité levuricide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité - phase 2 étape 2 ».

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 13697 "Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative carrier test for the evaluation of yeasticidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas - Phase 2 Step 2 " .*

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

L'essai décrit ci après, a été effectué avec des conditions additionnelles, les résultats obtenus avec les conditions obligatoires sont reportés dans le rapport N°35957.

*The test described below has been performed with additional conditions, the results obtained with the obligatory conditions were carried out in the expert report N°35957.*

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

| | |
|---|---|
| Code formule<br>*Code formula* | **FC 913019** |
| Numéro d'identification de l'échantillon<br>*Identification of the sample* | **4589 17 08 13697** |
| Numéro de lot<br>*Batch number* | **2446FM0410** |
| Fabricant<br>*Manufacturer* | **ECOLAB** |
| Date de réception au laboratoire<br>*Receipt date at the laboratory* | Le 31/07/17<br>*On the 31/07/17* |
| Conditions de stockage au laboratoire<br>*Storage conditions at the laboratory* | T° ambiante et obscurité<br>*Room temperature and darkness* |
| Substances actives<br>*Activ substances* | Solution à 20g/l : > 1000 ppm acide peracetique(CAS 79-21-0)<br>*Solution of 20g/l : > 1000 ppm peracetic acid (CAS 79-21-0)* |
| Période d'essai<br>*Period of analysis* | Du 02/08/17 au 04/08/17<br>*From 02/08/17 to 04/08/17* |

## 5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)*

### 5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)*

| | |
|---|---|
| Température de l'essai<br>*Test temperature* | 18 à 25°C ± 1°C |
| Temps de contact<br>*Contact Time* | **5 minutes** ± 10s |
| Nature du support<br>*Nature of the carrier* | Inox<br>*Stainless Steel* |
| Diluant de la formule lors des essais<br>*Diluent of the formula used during the test* | Eau dure<br>*Hard water* |
| Apparence de la formule et de ses dilutions<br>*Appearance formula dilutions* | Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai<br>*Preparation physically homogeneous and stable during test* |
| Souche testée<br>*Tested strain* | ○ **Candida albicans DSM 1386 (équivalent ATCC 10231)** |
| Pourcentage de spores échinulées<br>*Spiny spores percentage* | Non concerné<br>*Not concerned* |
| Substance interférente<br>*Interfering substance* | Albumine bovine à 3g/l<br>*3 g/l BSA* |
| Stabilité du mélange formule et substances interférentes<br>*Stability of the mixture (formula and interfering substance)* | Absence de précipité pendant l'essai<br>*Precipitate absent throughout the test* |
| Température d'incubation<br>*Incubation temperature* | 30°C ± 1°C<br>*30°C ± 1°C* |

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

| | |
|---|---|
| Nature du neutralisant utilisé<br>*Nature of the neutralizer agent used* | ○ Formule : F002<br>○ *Formula : F002* |
| Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement<br>*Neutralizer agent added to the counting medium* | ø<br>ø |

## 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 **1%** de la formule **FC 913019** soumise à l'essai.

*Checking of the method and validation of the method by dilution neutralisation for the **1%** test concentration of the formula **FC 913019** to be tested.*

| | Nombre de cellules viables (UFC/ml) *(Number of viable cells(CFU/ml))* | | | |
|---|---|---|---|---|
| Souche testée | Suspension d'essai | Validation des conditions expérimentales | Non Toxicité du neutralisant | Validation de la méthode |
| *Tested strain* | *Test suspension* | *Experimental conditions control* | *Neutralizer toxicity control* | *Method validation* |
| | *N* | *Nc* | *NC* | *NT* |
| **Candida albicans** | 5,78 | 5,68 | 5,78 | 5,74 |

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

N = Log d'UFC pour 0.05 ml de suspension d'essai - *Log FCU for 0.05 ml of test suspension*
Nc =Log d'UFC / surface d'essai pour le témoin eau – *Log FCU / surface test for water control*
NC = Log d'UFC par surface d'essai du témoin neutralisant - *Log FCU / surface test for neutralizer control*
NT = Log d'UFC par surface d'essai du témoin de neutralisation - *Log FCU / surface test for neutralization control*

N est $\geq$ à 5.57 $\log_{10}$ et $\leq$ à 6.10 $\log_{10}$
*Is $\geq$ at 5.57 $\log_{10}$ and $\leq$ at 6.10 $\log_{10}$*

Nc est $\geq$ 5.27 $\log_{10}$ - *Nc is $\geq$ at 5.27 $\log_{10}$*

NC est > à 0.5 Nc - *NC is > at 0.5 Nc*

NT est > à 0.5 Nc et n'est pas supérieur à ± 0.3 - *NT is > at 0.5 Nc and is not higher than ± 0.3*

La neutralisation est validée avec la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **1%** de la formule **FC 913019** et pour la souche soumise à l'essai.

The neutralization is validated with the method by dilution neutralisation for the **1%** test concentration of the formula **FC 913019** and for the tested strain.

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

| Souche testée | Nombre d'UFC par surface d'essai pour le mélange d'essai (Nd) pour les concentrations de : %(v/v) | | |
|---|---|---|---|
| Tested strain | Number of CFU by test surface for the test mixture (Nd) for the concentrations of : %(v/v) | | |
| | 0,01 | 0,1 | 1 |
| **Candida albicans** | 4,59 | 2,74 | <0,10 |

| Souche testée | R = Réduction Logarithmique R = Nc - Nd | | |
|---|---|---|---|
| Tested strain | R = Logarithmic reduction R = Nc - Nd | | |
| | 0,01 | 0,1 | 1 |
| **Candida albicans** | 1,09 | 2,94 | > 5,58 |

## 7. Conclusion (Conclusion)

Selon la norme NF EN 13697 (Juin 2015), la formule **FC 913019,** lorsqu'elle est diluée à la concentration de 1,00 **%** (m/v) dans de l'eau dure, présente une activité levuricide additionnelle en **5 minutes** de contact en conditions de saleté, vis-à-vis de la souche de référence : ***Candida albicans.***

According to the European standard NF EN 13697 (June 2015), the formula ***FC 913019*** *,when diluted at the concentration of* ***1,00%*** *(w/v) in hard water, presents an additional yeasticidal activity in a 5 minute contact time in dirty conditions against the referenced strain :* ***Candida albicans.***

## 8. Annexe - Données expérimentales ( Experimental Data )

*Candida albicans - 5 minutes*

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
Norme NF EN 13697 (fongicidie) *Juin 2015*

**Réf : FS125S**
**Date : 05/10/15**

*Date:* 02.08.17

*Numéro d'identification:* 4589 17 08 13697

**Dénombrement de la suspension fongique :**

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 colonies/boite | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Dilution - 5 | Dilution - 6 | Dilution - 5 | Dilution - 6 |
| Candida albicans DSM 1386 (équivalent ATCC 10231) | 241<br>239 | 26<br>24 | 241<br>239 | 26<br>24 |
| | Lecture à 24 heures | | Lecture à 48 heures | |

c : somme des valeurs de Vc prises en compte 530
n1 : nombre de valeurs de Vc prises en compte dans la plus faible dilution 2
n2 : nombre de valeurs de Vc prises en compte dans la plus forte dilution 2
d : taux de dilution de la plus faible dilution - 5

Moyenne pondérée : $N = \log \frac{0{,}025 \times c}{(n1 + 0{,}1n2) \times d}$ = 5,78 Q = 9,6

**Essai de validation :** *Temps de contact :* KP 5'

| | | -2 | -3 | -4 | -5 | Nts | Nc; NT; NC = $\log \frac{c \times 10}{n \times d}$ ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| c | 24h | + + | 51 45 | 3 4 | 0 0 | 0 | Nc = log ( 96 ) / 2 × 10 / $10^{-3}$ = 5,68 |
| | | | | | | | Nc • 5,27 logs |
| | 48h | + + | 51 45 | 3 4 | 0 0 | 0 | Conforme |
| C | 24h | + + | 60 60 | 8 7 | 0 0 | | NC = log ( 120 ) / 2 × 10 / $10^{-3}$ = 5,78 |
| | | | | | | | NC > 0,5 Nc |
| | 48h | + + | 60 60 | 8 7 | 0 0 | | Conforme |
| T | 24h | + + | 52 58 | 12 8 | 0 0 | | NT = log ( 110 ) / 2 × 10 / $10^{-3}$ = 5,74 |
| | | | | | | | NT > 0,5 Nc |
| 1 % | 48h | + + | 52 58 | 12 8 | 0 0 | | Conforme |

Nc : logarithme du nombre d'UFC par surface d'essai pour le témoin eau
NC : logarithme du nombre d'UFC par surface d'essai du témoin neutralisation
NT : logarithme du nombre d'UFC apr surface d'essai du neutralisant
c : somme des valeurs de Vc prises en compte
n : nombre de valeurs de Vc prises en compte
d : dilution prise en compte
Nts : nombre de microorganismes restant sur le support

La neutralisation est validée: Oui

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
Norme NF EN 13697 (fongicidie) *Juin 2015*

**Réf : FS125S**
**Date : 05/10/15**

*Numéro d'identification:* 4589 17 08 13697 *Temps de contact :* KP 5'

**Essai proprement dit :**

| Volume pipeté de produit pour fiole 100mL (mL) | Concentrations (%) | | 0 | -1 | -2 | Nts | Nd = log (( m + m' + n + n' ) / 2,2 × V x d |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,01 | 0,01 | 24h | + + | + + | 37 40 | 0 | Nd = log ( 77 ) /2 × 10/10 $^{-2}$ = 4,59 |
| | | 48h | + + | + + | 37 40 | 0 | |
| 0,1 | 0,1 | 24h | 54 55 | 4 2 | 0 0 | 0 | Nd = log ( 109 ) /2 × 10/10 $^{0}$ = 2,74 |
| | | 48h | 54 55 | 4 2 | 0 0 | 0 | |
| 1 | 1 | 24h | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 | Nd = log ( 28 ) /2 × 10/10 $^{0}$ = < 0,10 |
| | | 48h | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 | |
| | | 24h | | | | | Nd = log ( 28 ) /2 × 10/10 $^{0}$ = |
| | | 48h | | | | | |

m, m' : réplicats de la plus faible dilution, exprimés en UFC
n, n' : réplicats de la plus faible dilution, exprimés en UFC
V : volume inoculé dans la boîte, exprimés en ml
d : taux de dilution le plus faible

**Calcul de réduction :**

| Concentrations | R = Nc - Nd |
|---|---|
| 0,01 | R = 5,68 - 4,59 = 1,09 |
| 0,1 | R = 5,68 - 2,74 = 2,94 |
| 1 | R = 5,68 - < 0,10 = > 5,58 |
| | R = - = |

Activité fongicide : Réduction logarithmique • 3
VISA : Conforme
SUITE A DONNER :

# Direction Scientifique

**Liste des signataires du document**

Nom_utilisateur : Chrystèle Pluchart
Titre : Responsable Laboratoire de Microbiologie
Date : jeudi, 21 septembre 2017, 16:08 Paris
Signification : Validation de document
==========

Nom_utilisateur : Gaetan Rauwel
Titre : Directeur Recherche et Développement
Date : jeudi, 21 septembre 2017, 17:28 Paris
Signification : Validation de document
==========

==========
N Demande : 35956
Rapport d'essai : A 17 166 13697

Etude : NF EN 13697 fongicide

Date du document : 21/09/2017
==========

Laboratoires ANIOS
Laboratoire de microbiologie

cofrac ESSAIS
ACCREDITATION N°1-6419 PORTEE DISPONIBLE SUR WWW.COFRAC.FR

Sainghin en Mélantois, le 21 septembre 2017
*Sainghin en Mélantois, on the September 21 th 2017*

Rapport d'essai : N° A 17 137 13704
*Test report : N° A 17 137 13704*

## 1. Objet de la demande *(Study Number)* n° 35902

Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité sporicide de la formule **FC 913019.** Méthode d'essai et prescriptions (phase 2 - étape 1) selon NF EN 13704 - (Avril 2002). Application aux désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité.
Indice de classement T 72 - 233
Méthode par dilution neutralisation.

*Chemical antiseptics and disinfectants. Quantitative suspension test for the evaluation of the sporicidal activity of the formula **FC 913019.** Test method and prescriptions (phase 2 - step 1) according to NF EN 13704 (April 2002). Application to chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas.*
*Classification index T 72 - 233*
*Dilution neutralization method.*

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.*

**Laboratoires ANIOS SAS**
*Adresse : Pavé du moulin – 59260 Lille-Hellemmes*
*Tél. +33 3 20 67 67 67 – Fax : + 33 3 20 67 67 68*
*SIREN : 823 326 061 – SIRET : 823 326 061 00020*
*VAT : FR71823326061 – Capital Social : 773 630 132 euros*

## 2. Sommaire *(Summary)*


1. Objet de la demande *(Study Number)* n° 35902 1

2. Sommaire *(Summary)* 2

3. Introduction *(Introduction)* 3

4. Identification de l'échantillon *(Sample Identification)* 3

5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)* 4

5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)* 4
5.2. Méthode par dilution neutralisation *(Method by dilution neutralisation)* 4

6. Résultats *(Results)* 5

6.1. Essais de validation des conditions expérimentales *(Validation tests)* 5
6.2. Essais d'activité sporicide *(Evaluation of sporicidal activity)* 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 13704 « Antiseptiques et désinfectants chimiques ». Essai de suspension dans des conditions représentatives de celles de la pratique.

Détermination de l'activité sporicide 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 13704 « Chemical antiseptics and disinfectants ». Suspension test in conditions representing those practical ones.*

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

L'essai décrit ci après, a été effectué avec des conditions additionnelles, les résultats obtenus avec les conditions obligatoires sont reportés dans le rapport N°35903.

*The test described below has been performed with additional conditions; the obligatory conditions were carried out in the expert report N° 35903.*

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

| | |
|---|---|
| Code formule<br>*Code formula* | **FC 913019** |
| Numéro d'identification de l'échantillon<br>*Identification of the sample* | **4755 17 08 13704** |
| Numéro de lot<br>*Batch number* | **2446FM0410** |
| Fabricant<br>*Manufacturer* | **ECOLAB** |
| Date de réception au laboratoire<br>*Receipt date at the laboratory* | Le 31/07/17<br>*On the 31/07/17* |
| Conditions de stockage au laboratoire<br>*Storage conditions at the laboratory* | T° ambiante et obscurité<br>*Room temperature and darkness* |
| Substances actives<br>*Activ substances* | Solution à 20g/l : > 1000 ppm acide peracetique(CAS 79-21-0)<br>*Solution of 20g/l : > 1000 ppm peracetic acid (CAS 79-21-0)* |
| Période d'essai<br>*Period of analysis* | Du 08/08/17 au 11/08/17<br>*From 08/08/17 to 11/08/17* |

## 5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)*

### 5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)*

| | |
|---|---|
| Température de l'essai<br>*Test temperature* | 20°C ± 1°C |
| Temps de contact<br>*Contact Time* | **15 minutes** ± 10s |
| Diluant de la formule lors des essais | Eau dure |
| *Diluent of the formula used during the test* | *Hard water* |
| Apparence de la formule et de ses dilutions | Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai |
| *Appearance formula dilutions* | *Preparation physically homogeneous and stable during test* |
| Souche testée<br>*Tested strain* | ○ **Bacillus subtilis CIP 5262 (équivalent ATCC 6633)** |
| Substance interférente | Albumine bovine à 0,3g/l |
| *Interfering substance* | *0,3 g/l BSA* |
| Stabilité du mélange formule et substances interférentes | Absence de précipité pendant l'essai |
| *Stability of the mixture (formula and interfering substance)* | *Precipitate absent throughout the test* |
| Température d'incubation | 30°C ± 1°C |
| *Incubation temperature* | *30°C ± 1°C* |

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

| | |
|---|---|
| Nature du neutralisant utilisé | ○ Formule : F002 |
| *Nature of the neutralizer agent used* | ○ *Formula : F002* |
| Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement | 10% |
| *Neutralizer agent added to the counting medium* | *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 **2%** de la formule **FC 913019** soumise à l'essai.

*Checking of the method and validation of the method by dilution neutralisation for the **2%** test concentration of the formula **FC 913019** to be tested.*

| | Nombre de cellules viables (UFC/ml) *(Number of viable cells(CFU/ml))* | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Souche testée | Suspension d'essai | Validation suspension | Validation conditions expérimentales | Non toxicité du neutralisant | Inactivation par dilution neutralisation |
| *Tested strain* | *Test suspension* | *Validation suspension* | *Experimental conditions control* | *Neutralizer toxicity control* | *Dilution neutralization control* |
| | *N* | *Nv* | *A* | *B* | *C* |
| **Bacillus subtilis CIP 5262 (équivalent ATCC 6633)** | $2{,}2.10^6$ | $6{,}4.10^2$ | $7{,}8.10^2$ | $7{,}1.10^2$ | $7{,}1.10^2$ |

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

N est compris entre 1,5 x $10^6$ UFC/ml et 5 x $10^6$ UFC/ml
*Is comprised between 1,5 x $10^6$ CFU/ml and 5 x $10^6$ CFU/ml*

$N_V$ est compris entre 6.0 x $10^2$ UFC/ml et 3.0 x $10^3$ UFC/ml
*is comprised between 6.0x $10^2$ CFU/ml and 3.0 x $10^3$ CFU/ml*

A est supérieur ou égal à 0.05 x $N_V$
*is higher or equal to 0.05 x $N_V$*

B est supérieur ou égal à 0.05 x $N_V$
*is higher or equal to 0.05 x $N_V$*

C est supérieur ou égal à 0.5 x B
*is higher or equal to 0.5 x B*

La neutralisation est validée avec la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **2%** de la formule **FC 913019** et pour la souche soumise à l'essai.

The neutralization is validated with the method by dilution neutralisation for the **2%** test concentration of the formula **FC 913019** and for the tested strain.

## 6.2. Essais d'activité sporicide *(Evaluation of sporicidal 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) | | |
| | 0,5 | 1 | 2 |
| **Bacillus subtilis CIP 5262 (équivalent** | $>3{,}0.10^3$ | $<1{,}7.10^2$ | $<1{,}5.10^2$ |

| | Réduction du nombre de cellule viables à la concentration d'essai. | | |
|---|---|---|---|
| | Reduction of the number of viable cells at the test concentration. | | |
| | 0,5 | 1 | 2 |
| **Bacillus subtilis CIP 5262 (équivalent** | $<7{,}3.10^1$ | $>1{,}3.10^3$ | $>1{,}5.10^3$ |

## 7. Conclusion (Conclusion)

Selon la norme NF EN 13704 (Avril 2002), la formule **FC 913019,** lorsqu'elle est diluée à la concentration de 1,00 **%** (m/v) dans de l'eau dure, présente une activité sporicide additionnelle en **15 minutes** de contact à 20°C en conditions de propreté, vis-à-vis de la souche de référence: ***Bacillus subtilis CIP 5262 .***

*According to the European standard NF EN 13704 (April 2002), the formula* ***FC 913019*** *,when diluted at the concentration of* ***1,00%*** *(w/v) in hard water, presents an additional sporicidal activity in a 15 minute contact time at 20°C in clean conditions against the referenced strain :* ***Bacillus subtilis CIP 5262 .***

## 8. Annexe - Données expérimentales ( Experimental Data )

*Bacillus subtilis CIP 5262 (équivalent ATCC 6633) - 15 minutes*

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13704
méthode par dilution neutralisation *Avril 2002*

**Réf : FS 185O**
**Date : 20/10/15**

*Date:* 08.08.17 — *Réd :* 3 log

*Numéro d'identification :* 4755 17 08 13704

**Dénombrement de la suspension microbienne :**

| | Dénombrement : 15 à 300 colonies/boite | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Souche** | **Dilution -4** | **Dilution -5** | **Dilution -4** | **Dilution -5** |
| Bacillus subtilis CIP 5262 (équivalent ATCC 6633) | 224 | 25 | 224 | 25 |
| | 212 | 21 | 212 | 21 |
| | **Lecture intermédiaire à 48 heures** | | **Dénombrement à 72 heures** | |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boites considérées..... 482
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 :.....$10^{-4}$

Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1+0,1\times n2)\times d}$ = 2,2E+06 UFC/ml

**Essai de validation :** *Temps de contact :* FH 15'

| | | De 15 à 300 UFC/boite | De 15 à 300 UFC/boite |
|---|---|---|---|
| $N_V$ : | témoin suspension | 64 | 64 |
| | | 64 | 64 |
| A : | témoin des conditions expérimentales | 82 | 82 |
| | | 74 | 74 |
| B : | témoin de non-toxicité du neutralisant | 73 | 73 |
| | | 68 | 68 |
| C : | essai de l'inactivation par dilution/neutralisation à 2 % | 70 | 70 |
| | | 72 | 72 |
| | | **Lecture intermédiaire à 48 heures** | **Dénombrement à 72 heures** |

Calcul : $\frac{C}{n\times d\times v}$ ( en UFC/mL)

C : somme des colonies dénombrées sur les deux boites.
n : nombre de boites considérées.
d : facteur de dilution : $10^{-1}$
v : volume de l'échantillon : 1ml.



FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 13704
méthode par dilution neutralisation *Avril 2002*

**Réf : FS 185O**
**Date : 20/10/15**

*Numéro d'identification :* 4755 17 08 13704

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| $N_V$ | C | $\frac{128}{2\times0,1\times1}$ | = 6,4E+02 | UFC/mL |
| A | C | $\frac{156}{2\times0,1\times1}$ | = 7,8E+02 | UFC/mL |
| B | C | $\frac{141}{2\times0,1\times1}$ | = 7,1E+02 | UFC/mL |
| C | C | $\frac{142}{2\times0,1\times1}$ | = 7,1E+02 | UFC/mL |

Interprétation :

| | | |
|---|---|---|
| N est compris entre 1,5.10^6 UFC/ml et 5.10^6 UFC/ml | 2,2E+06 | Oui |
| $N_V$ est compris entre $6.10^2$ et $3.10^3$ | 6,4E+02 | Oui |
| A est supérieur ou égal à 0.05 x $N_V$ | 7,8E+02 | Oui |
| B est supérieur ou égal à 0.05 x $N_V$ | 7,1E+02 | Oui |
| C est supérieur ou égal à 0,5 x B | 7,1E+02 | Oui |

**La neutralisation est validée :** Oui

*Temps de contact :* FH 15'

**Essai :**

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Volume pipeté de produit pour fiole 100ml (ml) | 1/4 de 2% | 1/2 de 2% | 2,5 | | | |
| Concentration produit (%) | 0,5 | 1 | 2 | | | |
| Lecture intermédiaire à 48h de **15 à 300** UFC / boîte | + | 14 | 0 | | | |
| | + | 18 | 0 | | | |
| Dénombrement à 72h de **15 à 300** UFC / boîte | + | 14 | 0 | | | |
| | + | 18 | 0 | | | |
| $\frac{C}{nxdxv}$ = Na | > 3,0E+03 | < 1,7E+02 | < 1,5E+02 | | | |

R = Réduction du nombre de cellules viables = ( N x $10^1$ ) / Na

| | 0,5 | 1 | 2 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Calcul de réduction = | < 7,3E+01 | > 1,3E+03 | > 1,5E+03 | | | |

Suite à donner :
VISA Conforme

Lieu archivage : Laboratoire Microbiologie
Durée : Illimitée
Collecté par : TL
Responsable archivage : RLM
Classement & indexage : Par produit
Vérifié et approuvé par RLM et RQL le 20/10/2015

# Direction Scientifique

**Liste des signataires du document**

Nom_utilisateur : Chrystèle Pluchart
Titre : Responsable Laboratoire de Microbiologie
Date : jeudi, 21 septembre 2017, 16:04 Paris
Signification : Validation de document
==========

Nom_utilisateur : Gaetan Rauwel
Titre : Directeur Recherche et Développement
Date : jeudi, 21 septembre 2017, 17:27 Paris
Signification : Validation de document
==========

==========
N Demande : 35902
Rapport d'essai : A 17 137 13704

Etude : NF EN 13704

Date du document : 21/09/2017
==========

laboratoires ANIOS
Laboratoire de microbiologie

cofrac ESSAIS
ACCREDITATION N°1-6419 PORTEE DISPONIBLE SUR WWW.COFRAC.FR

Sainghin en Mélantois, le 21 septembre 2017
*Sainghin en Mélantois, on the September 21th 2017*

Rapport d'essai : N° A 17 133 13727
*Test report : N° A 17 133 13727*

## 1. Objet de la demande *(Study Number)* n° 35896

Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de la formule **FC 913019.** Méthode d'essai et prescriptions (phase 2 - étape 1) NF EN 13727 + A2 (Décembre 2015). Application aux désinfectants chimiques dans le domaine médical

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 **FC 913019.** Test method and prescriptions (phase 2 - step 1) according to NF EN 13727 + A2 (December 2015). Application to chemical disinfectants in the medical area.*
*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 10 pages numérotées dont 1 annexe de 3 pages
*This report is made of 10 numbered pages including 1 annex of 3 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.*

**Laboratoires ANIOS SAS**
*Adresse : Pavé du moulin – 59260 Lille-Hellemmes*
*Tél. +33 3 20 67 67 67 – Fax : + 33 3 20 67 67 68*
*SIREN : 823 326 061 – SIRET : 823 326 061 00020*
*VAT : FR71823326061 – Capital Social : 773 630 132 euros*

## 2. Sommaire *(Summary)*


1. Objet de la demande *(Study Number)* n° 35896 1

2. Sommaire *(Summary)* 2

3. Introduction *(Introduction)* 3

4. Identification de l'échantillon *(Sample Identification)* 3

5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)* 4

   5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)* 4
   5.2. Méthode par dilution neutralisation *(Method by dilution neutralisation)* 4

6. Résultats *(Results)* 5

   6.1. Essais de validation des conditions expérimentales *(Validation tests)* 5
   6.2. Essais d'activité bactéricide *(Evaluation of bactericidal activity)* 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<br>*Code formula* | **FC 913019** |
| Numéro d'identification de l'échantillon<br>*Identification of the sample* | **4573 17 08 13727** |
| Numéro de lot<br>*Batch number* | **2446FM0410** |
| Fabricant<br>*Manufacturer* | **ECOLAB** |
| Date de réception au laboratoire<br>*Receipt date at the laboratory* | Le 31/07/17<br>*On the 31/07/17* |
| Conditions de stockage au laboratoire<br>*Storage conditions at the laboratory* | T° ambiante et obscurité<br>*Room temperature and darkness* |
| Substances actives<br>*Activ substances* | Solution à 20g/l : > 1000 ppm acide peracetique(CAS 79-21-0)<br>*Solution of 20g/l : > 1000 ppm peracetic acid (CAS 79-21-0)* |
| Période d'essai<br>*Period of analysis* | Du 01/08/17 au 03/08/17<br>*From 01/08/17 to 03/08/17* |

## 5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)*

### 5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)*

| | |
|---|---|
| Température de l'essai<br>*Test temperature* | 20°C ± 1°C |
| Temps de contact<br>*Contact Time* | **5 minutes** ± 10s |
| Diluant de la formule lors des essais<br>*Diluent of the formula used during the test* | Eau dure<br>*Hard water* |
| Apparence de la formule et de ses dilutions<br>*Appearance formula dilutions* | Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai<br>*Preparation physically homogeneous and stable during test* |
| Souches testées<br>*Tested strains* | ○ **Pseudomonas aeruginosa CIP 103467 (équivalent ATCC 15442)**<br>○ **Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent ATCC 6538)**<br>○ **Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC 10541)** |
| Substance interférente<br>*Interfering substance* | Albumine bovine à 3g/l + 3ml/l érythrocytes<br>*3 g/l BSA + 3ml/l erythrocytes* |
| Stabilité du mélange formule et substances interférentes<br>*Stability of the mixture (formula and interfering substance)* | Absence de précipité pendant l'essai<br>*Precipitate absent throughout the test* |
| Température d'incubation<br>*Incubation temperature* | 37°C ± 1°C<br>*37°C ± 1°C* |

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

| | |
|---|---|
| Nature du neutralisant utilisé<br>*Nature of the neutralizer agent used* | ○ Formule : F002<br>○ *Formula : F002* |
| Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement<br>*Neutralizer agent added to the counting medium* | 10%<br>*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 **1%** de la formule **FC 913019** soumise à l'essai.

*Checking of the method and validation of the method by dilution neutralisation for the **1%** test concentration of the formula **FC 913019** 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* | *Nv* | *Nv 0* | *NvB* | *A* | *B* | *C* |
| **Pseudomonas aeruginosa CIP 103467** | $2{,}6.10^8$ | $2{,}6.10^7$ | $7{,}3.10^2$ | $7{,}3.10^1$ | $6{,}5.10^4$ | $7{,}3.10^1$ | $6{,}5.10^1$ | $5{,}1.10^1$ |
| **Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent ATCC** | $4{,}8.10^8$ | $4{,}8.10^7$ | $9{,}4.10^2$ | $9{,}4.10^1$ | $8{,}5.10^4$ | $9{,}1.10^1$ | $8{,}1.10^1$ | $6{,}4.10^1$ |
| **Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC** | $2{,}4.10^8$ | $2{,}4.10^7$ | $7{,}1.10^2$ | $7{,}1.10^1$ | $6{,}8.10^4$ | $6{,}5.10^1$ | $6{,}5.10^1$ | $7{,}0.10^1$ |

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

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

$N_0$ est compris entre 1,5 x $10^7$ UFC/ml et 5 x $10^7$ UFC/ml
*is comprised between 1.5 x $10^7$ CFU/ml and 5 x $10^7$ CFU/ml*

$N_V$ est compris entre 3 x $10^2$ UFC/ml et 1.6 x $10^3$ UFC/ml
*is comprised between 3 x $10^2$ CFU/ml and 1.6 x $10^3$ CFU/ml*

$N_{V0}$ est compris entre 3 x $10^1$ UFC/ml et 1.6 x $10^2$ UFC/ml
*is comprised between 3 x $10^1$ CFU/ml and 1.6 x $10^2$ CFU/ml*

$N_{VB}$ est compris entre 3 x $10^4$ UFC/ml et 1.6 x $10^5$ UFC/ml
*is comprised between 3 x $10^4$ CFU/ml and 1.6 x $10^5$ 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 **1%** de la formule **FC 913019** et pour les souches soumises à l'essai.

The neutralization is validated with the method by dilution neutralisation for the **1%** test concentration of the formula **FC 913019** 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) | | |
| | 0,01 | 0,1 | 1 |
| **Pseudomonas aeruginosa CIP** | $>3,3.10^4$ | $<1,4.10^2$ | $<1,4.10^2$ |
| **Staphylococcus aureus CIP 483** | $>3,3.10^4$ | $5,2.10^3$ | $<1,4.10^2$ |
| **Enterococcus hirae CIP 5855** | $>3,3.10^4$ | $2,9.10^2$ | $<1,4.10^2$ |

| | 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 | | |
| | 0,01 | 0,1 | 1 |
| **Pseudomonas aeruginosa CIP** | < 2,9 | > 5,3 | > 5,3 |
| **Staphylococcus aureus CIP 483** | < 3,2 | 4,0 | > 5,6 |
| **Enterococcus hirae CIP 5855** | < 2,9 | 4,9 | > 5,3 |

## 7. Conclusion (Conclusion)

Selon la norme NF EN 13727 + A2 (décembre 2015), la formule **FC 913019,** lorsqu'elle est diluée à la concentration de 1,00 **%** (m/v) dans de l'eau dure, présente une activité bactéricide en **5 minutes** de contact à 20°C en conditions de saleté, vis-à-vis des souches de référence ": ***Pseudomonas aeruginosa CIP 103467,Staphylococcus aureus CIP 483 , Enterococcus hirae CIP 5855.***

*According to the European standard NF EN 13727 + A2 ( December 2015), the formula* ***FC 913019*** *,when diluted at the concentration of* ***1,00%*** *(w/v) in hard water, presents a bactericidal activity in a 5 minute contact time at 20°C in dirty conditions against the referenced strains :* ***Pseudomonas aeruginosa CIP 103467 , Staphylococcus aureus CIP 483 , Enterococcus hirae CIP 5855 .***

## 8. Annexe - Données expérimentales ( Experimental Data )

*Pseudomonas aeruginosa CIP 103467 (équivalent ATCC 15442) - 5 minutes*

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: **4573 17 08 13727** *Date :* **01.08.17**
Type de produit testé : Surface
Méthode utilisée : Classique
Température : Inférieure à 40°C

Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boite | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Dilution -6 | Dilution -7 | Dilution -6 | Dilution -7 |
| Pseudomonas aeruginosa CIP 103467 (équivalent ATCC 15442) | 256 | 29 | 256 | 29 |
| | 242 | 36 | 242 | 36 |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boites considérées..... 563
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 : .....$10^{-6}$

Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0{,}1 \times n2) \times d}$ = 2,6E+08 UFC/ml N0=N/10= 2,6E+07

$5 < Q = \frac{\bullet\ dil - 6 / 2}{\bullet\ dil - 7 / 2} < 15 = \frac{249}{32{,}5}$ = 7,7

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: **4573 17 08 13727**

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Nv** | C $\frac{1460}{2}$ | = | 7,3E+02 | $N_{V0=}$ 7,3E+01 | UFC/mL |
| **NvB** | C $\frac{130000}{2}$ | = | 6,5E+04 | | UFC/mL |
| **A** | C $\frac{145}{2}$ | = | 7,3E+01 | | UFC/mL |
| **B** | C $\frac{129}{2}$ | = | 6,5E+01 | | UFC/mL |
| **C** | C $\frac{101}{2}$ | = | 5,1E+01 | | UFC/mL |

Interprétation :

| | | | |
|---|---|---|---|
| N est compris entre 1,5.10 ^ 8 UFC/ml et 5.10 ^ 8 UFC/ml | 2,6E+08 | | Oui |
| Nv est compris entre 3.10 ^ 2 et 1,6.10 ^ 3 | 7,3E+02 | | Oui |
| NvB est compris entre $3.10^4$ et $1{,}6.10^5$ | 6,5E+04 | | Oui |
| Nv0 est compris entre $3.10^1$ et $1{,}6.10^2$ | 7,3E+01 | | Oui |
| A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 | 7,3E+01 | et 5,1E+01 | Oui |
| B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB | 6,5E+01 | | Oui |

**La neutralisation est validée :** Oui

**Essai de validation :** *Temps de contact :* VD 5'

| | | De 14 à 330 UFC par boite | De 14 à 330 UFC par boite |
|---|---|---|---|
| **Nv :** | témoin suspension | 72 | 72 |
| | | 74 | 74 |
| **NvB :** | témoin suspension B | 68 | 68 |
| | | 62 | 62 |
| **A :** | témoin des conditions expérimentales | 76 | 76 |
| | | 69 | 69 |
| **B :** | témoin de non-toxicité du neutralisant | 62 | 62 |
| | | 67 | 67 |
| **C :** | essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 1 % | 54 | 54 |
| | | 47 | 47 |
| | | 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

**Essai :** *Temps de contact :* VD 5'

| Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | dilution au 1/100 de 1,25% | | dilution au 1/10 de 1,25% | | 1,25g | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Concentration produit %** | | **0,01** | | **0,1** | | **1** | | | |
| Dénombrement à **20h/24h** de **14 à 330** UFC par boîte | 0 | + | + | 2 | 0 | 0 | 0 | | |
| | -1 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | | | | | | | | | |
| Dénombrement à **40h/48h** de **14 à 330** UFC par boîte | 0 | + | + | 2 | 0 | 0 | 0 | | |
| | -1 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | | | | | | | | | |
| Na = $\frac{C \times 10}{n}$ *x dilution* | | > | 3,3E+04 | < | 1,4E+02 | < | 1,4E+02 | | |
| **Log N0 =** 7,4 | **Log Na =** | | 4,5 | | 2,1 | | 2,1 | | |
| Calcul de réduction = **Log $N_0$** - **Log Na** = **Log R** | | < | 2,9 | > | 5,3 | > | 5,3 | | |

SUITE A DONNER :
VISA : Conforme

# *Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent ATCC 6538) - 5 minutes*

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: **4573 17 08 13727**
*Date :* **01.08.17**
Type de produit testé : Surface
Méthode utilisée : Classique
Température : Inférieure à 40°C
Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boite | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Dilution -6 | Dilution -7 | Dilution -6 | Dilution -7 |
| Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent ATCC 6538) | + | 44 | + | 44 |
| | + | 52 | + | 52 |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boites considérées..... 96
n1 : nombre de boites prises en compte à la première dilution ..... 0
n2 : nombre de boites prises en compte à la deuxième dilution ..... 2
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte : .....10 $^{7}$

Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0{,}1 \times n2) \times d}$ = 4,8E+08 UFC/ml N0=N/10= 4,8E+07

$5 < Q = \frac{\bullet\ dil - 6 / 2}{\bullet\ dil - 7 / 2} < 15 =$ = Impossible

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: **4573 17 08 13727**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Nv** | C 1880 / 2 = | 9,4E+02 | $N_{v0=}$ 9,4E+01 | UFC/mL |
| **NvB** | C 170000 / 2 = | 8,5E+04 | | UFC/mL |
| **A** | C 181 / 2 = | 9,1E+01 | | UFC/mL |
| **B** | C 161 / 2 = | 8,1E+01 | | UFC/mL |
| **C** | C 127 / 2 = | 6,4E+01 | | UFC/mL |

Interprétation :

| | | | |
|---|---|---|---|
| N est compris entre 1,5.10 ^ 8 UFC/ml et 5.10 ^ 8 UFC/ml | 4,8E+08 | | Oui |
| Nv est compris entre 3.10 ^ 2 et 1,6.10 ^ 3 | 9,4E+02 | | Oui |
| NvB est compris entre $3.10^{4}$ et $1{,}6.10^{5}$ | 8,5E+04 | | Oui |
| Nv0 est compris entre $3.10^{1}$ et $1{,}6.10^{2}$ | 9,4E+01 | | Oui |
| A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 | 9,1E+01 | et 6,4E+01 | Oui |
| B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB | 8,1E+01 | | Oui |

**La neutralisation est validée :** Oui

**Essai de validation :** *Temps de contact :* VD 5'

| | | De 14 à 330 UFC par boite | De 14 à 330 UFC par boite |
|---|---|---|---|
| **Nv :** | témoin suspension | 96 | 96 |
| | | 92 | 92 |
| **NvB :** | témoin suspension B | 88 | 88 |
| | | 82 | 82 |
| **A :** | témoin des conditions expérimentales | 94 | 94 |
| | | 87 | 87 |
| **B :** | témoin de non-toxicité du neutralisant | 83 | 83 |
| | | 78 | 78 |
| **C :** | essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 1 % | 69 | 69 |
| | | 58 | 58 |
| | | 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

**Essai :** *Temps de contact :* VD 5'

| Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | dilution au 1/100 de 1,25% | | dilution au 1/10 de 1,25% | | 1,25g | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Concentration produit %** | | **0,01** | | **0,1** | | **1** | | | |
| Dénombrement à **20h/24h** de **14 à 330** UFC par boîte | 0 | + | + | + | + | 6 | 4 | | |
| | -1 | + | + | 47 | 56 | 0 | 0 | | |
| | | | | | | | | | |
| Dénombrement à **40h/48h** de **14 à 330** UFC par boîte | 0 | + | + | + | + | 6 | 4 | | |
| | -1 | + | + | 47 | 56 | 0 | 0 | | |
| | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Na = $\frac{C \times 10}{n}$ *x dilution* | > | 3,3E+04 | | 5,2E+03 | < | 1,4E+02 | | | |
| **Log N0 =** 7,7 | **Log Na =** | | 4,5 | | 3,7 | | 2,1 | | |
| Calcul de réduction = **Log $N_0$** - **Log Na** = **Log R** | < | 3,2 | | 4,0 | > | 5,6 | | | |

SUITE A DONNER :
VISA : Conforme

# *Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC 10541) - 5 minutes*

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: **4573 17 08 13727** *Date :* **01.08.17**
Type de produit testé : Surface
Méthode utilisée : Classique
Température : Inférieure à 40°C
Dénombrement de la suspension bactérienne:

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boite | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Dilution -6 | Dilution -7 | Dilution -6 | Dilution -7 |
| Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC 10541) | 246 | 23 | 246 | 23 |
| | 238 | 26 | 238 | 26 |
| | Lecture 20 à 24 heures | | Lecture 40 à 48 heures | |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boites considérées..... 533
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 : .....$10^{-6}$

Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d}$ = 2,4E+08 UFC/ml N0=N/10= 2,4E+07

$5 < Q = \frac{\bullet\ dil - 6 / 2}{\bullet\ dil - 7 / 2} < 15 = \frac{242}{24,5}$ = 9,9

**Essai de validation :** *Temps de contact :* VD 5'

| | | De 14 à 330 UFC par boite | De 14 à 330 UFC par boite |
|---|---|---|---|
| **Nv :** | témoin suspension | 72 | 72 |
| | | 69 | 69 |
| **NvB :** | témoin suspension B | 71 | 71 |
| | | 65 | 65 |
| **A :** | témoin des conditions expérimentales | 62 | 62 |
| | | 68 | 68 |
| **B :** | témoin de non-toxicité du neutralisant | 59 | 59 |
| | | 71 | 71 |
| **C :** | essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 1 % | 68 | 68 |
| | | 72 | 72 |
| | | 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

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: **4573 17 08 13727**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Nv** | C $\frac{1410}{2}$ = | 7,1E+02 | $N_{v0=}$ 7,1E+01 | UFC/mL |
| **NvB** | C $\frac{136000}{2}$ = | 6,8E+04 | | UFC/mL |
| **A** | C $\frac{130}{2}$ = | 6,5E+01 | | UFC/mL |
| **B** | C $\frac{130}{2}$ = | 6,5E+01 | | UFC/mL |
| **C** | C $\frac{140}{2}$ = | 7,0E+01 | | UFC/mL |

Interprétation :

| | | | |
|---|---|---|---|
| N est compris entre 1,5.10 ^ 8 UFC/ml et 5.10 ^ 8 UFC/ml | 2,4E+08 | | Oui |
| Nv est compris entre 3.10 ^ 2 et 1,6.10 ^ 3 | 7,1E+02 | | Oui |
| NvB est compris entre $3.10^4$ et $1,6.10^5$ | 6,8E+04 | | Oui |
| Nv0 est compris entre $3.10^1$ et $1,6.10^2$ | 7,1E+01 | | Oui |
| A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 | 6,5E+01 | et 7,0E+01 | Oui |
| B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB | 6,5E+01 | | Oui |

**La neutralisation est validée :** Oui

**Essai :** *Temps de contact :* VD 5'

| Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | dilution au 1/100 de 1,25% | | dilution au 1/10 de 1,25% | | 1,25g | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Concentration produit %** | | **0,01** | | **0,1** | | **1** | | | |
| Dénombrement à **20h/24h** de **14 à 330** UFC par boîte | 0 | + | + | 26 | 32 | 2 | 0 | | |
| | -1 | + | + | 5 | 3 | 0 | 0 | | |
| | | | | | | | | | |
| Dénombrement à **40h/48h** de **14 à 330** UFC par boîte | 0 | + | + | 26 | 32 | 2 | 0 | | |
| | -1 | + | + | 5 | 3 | 0 | 0 | | |
| | | | | | | | | | |
| Na = $\frac{C \times 10}{n}$ *x dilution* | | > | 3,3E+04 | | 2,9E+02 | < | 1,4E+02 | | |
| **Log N0 =** 7,4 | **Log Na =** | | 4,5 | | 2,5 | | 2,1 | | |
| Calcul de réduction = **Log $N_0$** - **Log Na** = **Log R** | | < | 2,9 | | 4,9 | > | 5,3 | | |

SUITE A DONNER :
VISA : Conforme

# Direction Scientifique

**Liste des signataires du document**

Nom_utilisateur : Chrystèle Pluchart
Titre : Responsable Laboratoire de Microbiologie
Date : jeudi, 21 septembre 2017, 15:26 Paris
Signification : Validation de document
==========

Nom_utilisateur : Gaetan Rauwel
Titre : Directeur Recherche et Développement
Date : jeudi, 21 septembre 2017, 17:24 Paris
Signification : Validation de document
==========

==========
N Demande : 35896
Rapport d'essai : A 17 133 13727

Etude : NF EN 13727

Date du document : 21/09/2017
==========

laboratoires ANIOS
Laboratoire de microbiologie

cofrac ESSAIS
ACCREDITATION N°1-6419 PORTEE DISPONIBLE SUR WWW.COFRAC.FR

Sainghin en Mélantois, le 21 septembre 2017
*Sainghin en Mélantois, on the September 21 st 2017*

Rapport d'essai : N° A 17 206 14348
*Test report : N° A 17 206 14348*

## 1. Objet de la demande *(Study Number)* n° 36068

Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité mycobactéricide de la formule **FC 913019.** Méthode d'essai et prescriptions (phase 2 - étape 1) NF EN 14348 (Juin 2005). Application aux désinfectants chimiques en médecine.

Indice de classement T 72-245.
Méthode par dilution neutralisation.

*Chemical antiseptics and disinfectants. Quantitative suspension test for the evaluation of the mycobactericidal activity of the formula **FC 913019.** Test method and prescriptions (phase 2 - step 1) according to NF EN 14348 (June 2005). Application to chemical disinfectants in the medical area.*

*Classification index T 72-245.*

*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 9 pages numérotées dont 1 annexe de 2 pages
*This report is made of 9 numbered pages including 1 annex of 2 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.*

**Laboratoires ANIOS SAS**
*Adresse : Pavé du moulin – 59260 Lille-Hellemmes*
*Tél. +33 3 20 67 67 67 – Fax : + 33 3 20 67 67 68*
*SIREN : 823 326 061 – SIRET : 823 326 061 00020*
*VAT : FR71823326061 – Capital Social : 773 630 132 euros*

## 2. Sommaire *(Summary)*


1. Objet de la demande *(Study Number)* n° 36068 1

2. Sommaire *(Summary)* 2

3. Introduction *(Introduction)* 3

4. Identification de l'échantillon *(Sample Identification)* 3

5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)* 4

   5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)* 4
   5.2. Méthode par dilution neutralisation *(Method by dilution neutralisation)* 4

6. Résultats *(Results)* 5

   6.1. Essais de validation des conditions expérimentales *(Validation tests)* 5
   6.2. Essais d'activité mycobactéricide *(Evaluation of mycobactericidal activity)* 6

7. Conclusion (Conclusion) 6

8. Annexe - Données expérimentales ( Experimental Data ) 7

## 3. Introduction *(Introduction)*

L'essai a été réalisé selon la méthodologie d'essai décrite dans la norme européenne EN 14348 « *Antiseptiques et désinfectants chimiques* ». Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité mycobactéricide des désinfectants chimiques utilisés pour les instruments en médecine. Phase 2 – Etape 1.

Détermination de l'activité mycobactéricide 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 14348 "Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative suspension test for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical disinfectants used for instruments in the medical area - Phase 2 Step 1" .*

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

L'essai décrit ci après, a été effectué avec des conditions additionnelles, les résultats obtenus avec les conditions obligatoires sont reportés dans le rapport N°36067.

*The test described below has been performed with additional conditions, the results obtained with the obligatory conditions were carried out in the expert report N°36067.*

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

| | |
|---|---|
| Code formule<br>*Code formula* | **FC 913019** |
| Numéro d'identification de l'échantillon<br>*Identification of the sample* | **5183 17 08 14348** |
| Numéro de lot<br>*Batch number* | **2446FM0410** |
| Fabricant<br>*Manufacturer* | **ECOLAB** |
| Date de réception au laboratoire<br>*Receipt date at the laboratory* | Le 31/07/17<br>*On the 31/07/17* |
| Conditions de stockage au laboratoire<br>*Storage conditions at the laboratory* | T° ambiante et obscurité<br>*Room temperature and darkness* |
| Substances actives<br>*Activ substances* | Solution of 20g/l : > 1000 ppm peracetic acid (CAS 79-21-0) |
| Période d'essai<br>*Period of analysis* | Du 30/08/17 au 20/09/17<br>*From 30/08/17 to 20/09/17* |

## 5. Méthode expérimentale *(Experimental Method)*

### 5.1. Conditions expérimentales *(Experimental conditions)*

| | |
|---|---|
| Température de l'essai<br>*Test temperature* | 20°C ± 1°C |
| Temps de contact<br>*Contact Time* | **10 minutes** ± 10s |
| Diluant de la formule lors des essais<br>*Diluent of the formula used during the test* | Eau dure<br>*Hard water* |
| Diluant de la formule lors des essais<br>*Appearance formula dilutions* | Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai<br>*Preparation physically homogeneous and stable during test* |
| Souches testées<br>*Tested strains* | ○ **Mycobacterium avium DSM 44157 (equivalent ATCC 15769)**<br>○ **Mycobacterium terrae CIP 104321 (equivalent ATCC 15755)** |
| Substance interférente<br>*Interfering substance* | Albumine bovine à 3g/l + 3ml/l érythrocytes<br>*3 g/l BSA + 3ml/l erythrocytes* |
| Stabilité du mélange formule et substances interférentes<br>*Stability of the mixture (formula and interfering substance)* | Absence de précipité pendant l'essai<br>*Precipitate absent throughout the test* |
| Température d'incubation<br>*Incubation temperature* | 37°C ± 1°C<br>*37°C ± 1°C* |

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

| | |
|---|---|
| Nature du neutralisant utilisé<br>*Nature of the neutralizer agent used* | ○ Formule : F002<br>○ *Formula : F002* |
| Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement<br>*Neutralizer agent added to the counting medium* | 10%<br>*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 **2%** de la formule **FC 913019** soumise à l'essai.

*Checking of the method and validation of the method by dilution neutralisation for the **2%** test concentration of the formula **FC 913019** to be tested.*

| | Nombre de cellules viables (UFC/ml) *(Number of viable cells(CFU/ml))* | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Souches testées | Suspension d'essai | Suspension d'essai / 10 | Validation suspension | Validation suspension / 10 | Validation conditions expérimentales | Non toxicité du neutralisant | Inactivation par dilution neutralisation |
| *Tested strains* | *Test suspension* | *Test suspension / 10* | *Validation suspension* | *Validation suspension / 10* | *Experimental conditions control* | *Neutralizer toxicity control* | *Dilution neutralization control* |
| | *N* | *N 0* | *Nv* | *Nv 0* | *A* | *B* | *C* |
| **Mycobacterium avium** | $2{,}7.10^{9}$ | $2{,}7.10^{8}$ | $6{,}9.10^{2}$ | $6{,}9.10^{1}$ | $7{,}5.10^{1}$ | $6{,}9.10^{1}$ | $7{,}5.10^{1}$ |
| **Mycobacterium terrae** | $2{,}1.10^{9}$ | $2{,}1.10^{8}$ | $6{,}7.10^{2}$ | $6{,}7.10^{1}$ | $6{,}5.10^{1}$ | $6{,}5.10^{1}$ | $7{,}1.10^{1}$ |

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

N est compris entre $1{,}5 \times 10^{9}$ UFC/ml et $5 \times 10^{9}$ UFC/ml

*is comprised between $1.5 \times 10^{9}$ CFU/ml and $5 \times 10^{9}$ CFU/ml*

$N_0$ est compris entre $1{,}5 \times 10^{8}$ UFC/ml et $5 \times 10^{8}$ UFC/ml

*is comprised between $1.5 \times 10^{8}$ CFU/ml and $5 \times 10^{8}$ CFU/ml*

$N_V$ est compris entre $3 \times 10^{2}$ UFC/ml et $1.6 \times 10^{3}$ UFC/ml

*is comprised between $3 \times 10^{2}$ CFU/ml and $1.6 \times 10^{3}$ CFU/ml*

$N_{V0}$ est compris entre $3 \times 10^{1}$ UFC/ml et $1.6 \times 10^{2}$ UFC/ml

*is comprised between $3 \times 10^{1}$ CFU/ml and $1.6 \times 10^{2}$ CFU/ml*

A,B,C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x $N_{V0}$

*is 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 **2%** de la formule **FC 913019** et pour les souches soumises à l'essai.

The neutralization is validated with the method by dilution neutralisation for the **2%** test concentration of the formula **FC 913019** and for the tested strains.

## 6.2. Essais d'activité mycobactéricide *(Evaluation of mycobactericidal 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) | | |
| | 0,5 | 1 | 2 |
| **Mycobacterium avium** | $7,6.10^4$ | $1,1.10^3$ | $<1,4.10^2$ |
| **Mycobacterium terrae** | $1,0.10^6$ | $<1,4.10^2$ | $<1,4.10^2$ |

| 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 | | |
| | 0,5 | 1 | 2 |
| **Mycobacterium avium** | 3,5 | 5,4 | > 6,3 |
| **Mycobacterium terrae** | 2,3 | > 6,2 | > 6,2 |

## 7. Conclusion (Conclusion)

Selon la norme NF EN 14348 (Juin 2005), la formule **FC 913019,** lorsqu'elle est diluée à la concentration de 1,00 **%** (m/v) dans de l'eau dure , présente une activité mycobactéricide additionnelle en **10 minutes** de contact à 20°C en conditions de saleté, vis-à-vis des souches de référence : ***Mycobacterium avium, Mycobacterium terrae.***

*According to the European standard NF EN 14348 (Juin 2005), the formula* ***FC 913019*** *,when diluted at the concentration of* ***1,00%*** *(w/v) in hard water, presents an additional mycobactericidal activity in a 10 minute contact time at 20°C in dirty conditions against the referenced strains :* ***Mycobacterium avium, Mycobacterium terrae.***

## 8. Annexe - Données expérimentales ( Experimental Data )

*Mycobacterium avium - 10 minutes*

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 14348
méthode par dilution-neutralisation *Juin 2005*

**Réf : FS134N**
**Date : 28/03/17**

*Date:* 30.08.17

*Numéro d'identification:* 5183 17 08 14348

**Dénombrement de la suspension bactérienne :**

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boite | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Dilution -7 | | dilution -8 | | Dilution -7 | | Dilution -8 | |
| Mycobacterium avium DSM 44157 | 177 | 99 | 20 | 21 | 177 | 99 | 20 | 21 |
| | 127 | 112 | 22 | 18 | 127 | 112 | 22 | 18 |
| | Lecture intermédiaire à 14 jours | | | | Lecture à 21 jours | | | |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boites considérées..... 596
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 : ..... $10^{-7}$

Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d}$ = 2,7E+09 UFC/ml  $N_0 = N/10$ = 2,7E+08 UFC/ml

$5 < Q = \frac{\bullet\ dil - 7 / 2}{\bullet\ dil - 8 / 2} < 15 = \frac{257,5}{40,5}$ = 6,4

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| $N_V$ | C 1380 / 2 | = | 6,9E+02 | $N_{v0=}$ 6,9E+01 UFC/mL |
| A | C 149 / 2 | = | 7,5E+01 | UFC/mL |
| B | C 137 / 2 | = | 6,9E+01 | UFC/mL |
| C | C 150 / 2 | = | 7,5E+01 | UFC/mL |

Interprétation :

| | | |
|---|---|---|
| N est compris entre $1,5.10^9$ UFC/ml et $5.10^9$ UFC/ml | 2,7E+09 | Oui |
| $N_v$ est compris entre $3.10^2$ et $1.6.10^3$ | 6,9E+02 | Oui |
| $N_{v0}$ est compris entre $3.10^1$ et $1,6.10^2$ | 6,9E+01 | Oui |
| A,B,C est supérieur ou égal à 0,5 x $N_{v0}$ | | Oui |

La neutralisation est validée : Oui

**Essai de validation :** *Temps de contact :* TL 10'

| | | De 14 à 330 UFC par boite | | De 14 à 330 UFC par boite | |
|---|---|---|---|---|---|
| $N_V$ : | témoin suspension | 38 | 40 | 38 | 40 |
| | | 33 | 27 | 33 | 27 |
| A : | témoin des conditions expérimentales | 30 | 45 | 30 | 45 |
| | | 38 | 36 | 38 | 36 |
| B : | témoin de non-toxicité du neutralisant | 41 | 27 | 41 | 27 |
| | | 30 | 39 | 30 | 39 |
| C : | essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 2 % | 37 | 32 | 37 | 32 |
| | | 39 | 42 | 39 | 42 |
| | | Lecture intermédiaire à 14 jours | | Lecture à 21 jours | |

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

$N_w = \frac{c \times 10}{(n1 + 0,1n2) \times 10^{-5}}$ (en UFC/ml).

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



FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 14348
méthode par dilution-neutralisation *Juin 2005*

**Réf : FS134N**
**Date : 28/03/17**

*Numéro d'identification:* 5183 17 08 14348

**Essai :** *Temps de contact :* TL 10'

| Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 0,625 | | 1,25 | | 2,5 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Concentration produit %** | | **0,5** | | **1** | | **2** | | | |
| Lecture intermédiaire à **14 jours** de **14 à 330** UFC par boîte | 0 | + | + | 62 | 51 | 4 | 2 | | |
| | | + | + | 44 | 56 | 3 | 5 | | |
| | -1 | + | + | 6 | 4 | 0 | 0 | | |
| | | + | + | 5 | 4 | 1 | 0 | | |
| | -2 | 40 | 36 | 1 | 0 | 0 | 0 | | |
| | | 38 | 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | -3 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| Dénombrement à **21 jours** de **14 à 330** UFC par boîte | 0 | + | + | 62 | 51 | 4 | 2 | | |
| | | + | + | 44 | 56 | 3 | 5 | | |
| | -1 | + | + | 6 | 0 | 0 | 0 | | |
| | | + | + | 5 | 4 | 1 | 0 | | |
| | -2 | 40 | 36 | 1 | 0 | 0 | 0 | | |
| | | 38 | 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | -3 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| Na = $\frac{C \times 10}{n}$ *x dilution* | | | **7,6E+04** | | **1,1E+03** | < | **1,4E+02** | | |
| **Log $N_0$ =** 8,4 | **Log Na =** | | **4,9** | | **3,0** | | **2,1** | | |
| Calcul de réduction = **Log $N_0$** - **Log Na** = **Log R** | | | **3,5** | | **5,4** | **>** | **6,3** | | |

SUITE A DONNER :
VISA : Conforme

Lieu archivage : Laboratoire Microbiologie
Durée : Illimitée
Collecté par : TL
Responsable archivage : RQL
Classement & indexage : Par produit
Vérifiée et approuvée par RLM et RQL le 28/03/2017

# *Mycobacterium terrae - 10 minutes*

FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 14348
méthode par dilution-neutralisation *Juin 2005*

**Réf : FS134N**
**Date : 28/03/17**

*Date:* 30.08.17

*Numéro d'identification:* 5183 17 08 14348

**Dénombrement de la suspension bactérienne :**

| Souche | Dénombrement : 14 à 330 UFC par boite | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Dilution -7 | | dilution -8 | | Dilution -7 | | Dilution -8 | |
| Mycobacterium terrae CIP 104321 | 99 | 105 | 9 | 10 | 99 | 105 | 9 | 10 |
| | 100 | 123 | 12 | 10 | 100 | 123 | 12 | 10 |
| | Lecture intermédiaire à 14 jours | | | | Lecture à 21 jours | | | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $N_V$ | C $\frac{1330}{2}$ | = | 6,7E+02 | $N_{v0=}$ 6,7E+01 | UFC/mL |
| A | C $\frac{130}{2}$ | = | 6,5E+01 | | UFC/mL |
| B | C $\frac{129}{2}$ | = | 6,5E+01 | | UFC/mL |
| C | C $\frac{141}{2}$ | = | 7,1E+01 | | UFC/mL |

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boites considérées..... 468
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 : ..... $10^{-7}$

Interprétation :

| | | |
|---|---|---|
| .....N est compris entre $1,5.10^9$ UFC/ml et $5.10^9$ UFC/ml | 2,1E+09 | Oui |
| ..... $N_V$ est compris entre $3.10^2$ et $1.6.10^3$ | 6,7E+02 | Oui |
| ..... $N_{v0}$ est compris entre $3.10^1$ et $1,6.10^2$ | 6,7E+01 | Oui |
| ..... A,B,C est supérieur ou égal à 0,5 x $N_{v0}$ | | Oui |

Moyenne pondérée : $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d}$ = 2,1E+09 UFC/ml $N_0 = N/10$ = 2,1E+08 UFC/ml

La neutralisation est validée : Oui

$5 < Q = \frac{\bullet\ dil - 7 / 2}{\bullet\ dil - 8 / 2} < 15 = \frac{213,5}{20,5}$ = 10,4

**Essai de validation :** *Temps de contact :* TL 10'

| | | De 14 à 330 UFC par boite | | De 14 à 330 UFC par boite | |
|---|---|---|---|---|---|
| $N_V$ : | témoin suspension | 27 | 35 | 27 | 35 |
| | | 33 | 38 | 33 | 38 |
| A : | témoin des conditions expérimentales | 32 | 33 | 32 | 33 |
| | | 30 | 35 | 30 | 35 |
| B : | témoin de non-toxicité du neutralisant | 24 | 38 | 24 | 38 |
| | | 32 | 35 | 32 | 35 |
| C : | essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 2 % | 30 | 39 | 30 | 39 |
| | | 40 | 32 | 40 | 32 |
| | | Lecture intermédiaire à 14 jours | | Lecture à 21 jours | |

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

$N_w = \frac{c \times 10}{(n1 + 0,1n2) \times 10^{-5}}$ (en UFC/ml).

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



FICHE DE RESULTATS D'ESSAIS
NORME NF EN 14348
méthode par dilution-neutralisation *Juin 2005*

**Réf : FS134N**
**Date : 28/03/17**

*Numéro d'identification:* 5183 17 08 14348

**Essai :** *Temps de contact :* TL 10'

| Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml | | 0,625 | | 1,25 | | 2,5 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Concentration produit %** | | **0,5** | | **1** | | **2** | | | |
| Lecture intermédiaire à **14 jours** de **14 à 330** UFC par boîte | 0 | + + | + + | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 0 | | |
| | -1 | + + | + + | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 0 | | |
| | -2 | + + | + + | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 0 | | |
| | -3 | 54 62 | 51 39 | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 0 | | |
| Dénombrement à **21 jours** de **14 à 330** UFC par boîte | 0 | + + | + + | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 0 | | |
| | -1 | + + | + + | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 0 | | |
| | -2 | + + | + + | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 0 | | |
| | -3 | 54 62 | 51 39 | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 0 0 | | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Na = $\frac{C \times 10}{n}$ *x dilution* | | 1,0E+06 | < | 1,4E+02 | < | 1,4E+02 | | |
| Log $N_0$ = 8,3 | Log Na = | 6,0 | | 2,1 | | 2,1 | | |
| Calcul de réduction = Log $N_0$ - Log Na = Log R | | 2,3 | > | 6,2 | > | 6,2 | | |

SUITE A DONNER :

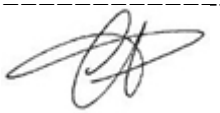
VISA : Conforme

Lieu archivage : Laboratoire Microbiologie
Durée : Illimitée
Collecté par : TL
Responsable archivage : RQL
Classement & indexage : Par produit
Vérifiée et approuvée par RLM et RQL le 28/03/2017

# Direction Scientifique

**Liste des signataires du document**

Nom_utilisateur : Gaetan Rauwel
Titre : Directeur Recherche et Développement
Date : jeudi, 21 septembre 2017, 17:32 Paris
Signification : Validation de document
==========



Nom_utilisateur : Chrystèle Pluchart
Titre : Responsable Laboratoire de Microbiologie
Date : jeudi, 21 septembre 2017, 17:32 Paris
Signification : Validation de document
==========

==========
N Demande : 36068
Rapport d'essai : A 17 206 14348

Etude : NF EN 14348

Date du document : 21/09/2017
==========