



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. 81424)

## **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”.

### 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

**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	<b>Incidin Active</b>
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
2.1.9 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<sup>-9</sup>. 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

100 $\mu$ l Load

+100 $\mu$ l DMEM+2%FCS

+800 $\mu$ l Product ( $\times 1.25$ )

From each of the test assay an 100 $\mu$ l aliquot is withdrawn already at time  $0\pm 5$ sec.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

4.15 Performance controls with formaldehyde

100 $\mu$ l virus inoculum preparation

+400 $\mu$ l PBS

\*+500 $\mu$ l 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 100 $\mu$ l aliquots are withdrawn and transferred to ice-cold supplemented DMEM + 2% FCS and serial 1:10 dilutions are prepared. 100 $\mu$ l 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<sub>50</sub>) by the method of *Spearman & Kärber*

$$m \text{ (TCID}_{50}\text{)} = X_k + d/2 - d \cdot \sum p_i$$

- m** = negative decadal logarithm TCID<sub>50</sub> in the first 1000µl aliquot
- X<sub>k</sub>** = decadal logarithm of the first dilution where all parallels (here 8) are positive
- D** = decadal logarithm of the dilution factor (here 1)
- P<sub>i</sub>** = ratio of positives in one series:

Positives	P <sub>i</sub>
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 **S<sub>m</sub>** is calculated according to the following formula

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

- S<sub>m</sub>** = standard deviation of the logarithmic titre
- d** = decadal logarithm of the dilution factor (here 1)
- P<sub>i</sub>** = ratio of positives in the parallels

In many cases it is observed that P<sub>i</sub> = 1 and P<sub>i+2</sub> = 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

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

**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.

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

in cases where the cytotoxic effects (CTE) exceed the cytopathic effects (CPE) the calculated reduction factors are indicated as “≥”. The confidence intervals **K<sub>RF</sub>** of the reduction factors are calculated following the formula:

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

## 6. Results

Incidin Active			
Parameter(s)		logarithmic reduction factor(s) incl. 95% confidence interval(s) against <i>Adenovirus</i> , 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  $\geq 4.0$ lg. 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





**Tab. 3 Formaldehyde control against Adenovirus, type 5, Adenoid 75 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	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	44444444	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	xxxxxxx Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	xxxxxxx Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	xxxxxxx Pi = 1	44444444 Pi = 1	44444444 Pi = 1	44444444 Pi = 1	44444444 Pi = 1	44444444 Pi = 1	44444444 Pi = 1	00000000 Pi = 0	00000000 Pi = 0	6.38±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	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	44444444 Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	xxxxxxx Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	xxxxxxx Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	xxxxxxx Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	44444444 Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	xxxxxxx Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	xxxxxxx Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	44444444 Pi = 1	44444444 Pi = 1	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	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 <sub>50</sub> after ...					>4 log <sub>10</sub> 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	RF				
	1.0	dirty conditions	1.5	4.88±0.25	≥4.88±0.25				sufficient within 10 min
				RF	RF	1.50±0.00	RF		
0.5	dirty conditions	1.5	6.38±0.25	1.50±0.00				sufficient within 10 min	
			RF	RF	≥5.00±0.00	RF			
0.1	dirty conditions	<0.5	6.50±0.00					Not sufficient within 60 min	
			RF						
WSH	-	dirty conditions	<0.5	6.38±0.25	6.38±0.25				
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	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 <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml incl. 95% Confidence interval(s) after							RF incl. 95% Confidence interval(s) after							≥4 log <sub>10</sub> 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														Sufficient within 10 min
	1.0	dirty	1.50±0.00		1.50±0.00		1.50±0.00												Sufficient within 10 min
	0.5	dirty	6.38±0.25		1.50±0.00		1.50±0.00		1.50±0.00										Sufficient within 10 min
	0.1	dirty	6.50±0.00		6.38±0.25		6.50±0.00		3.38±0.25										Not Sufficient within 60 min
WSH	-	dirty	6.38±0.25		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										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

## 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	<b>Incidin Active</b>
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
2.1.9 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<sup>-9</sup>. 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 = &lt;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 preparation	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  $0 \pm 5$ sec. 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  $\leq 0.5$ lg.



#### 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<sub>50</sub>) by the method of *Spearman & Kärber*

$$m \text{ (TCID}_{50}\text{)} = X_k + d/2 - d \cdot \sum p_i$$

$m$	=	negative decadal logarithm TCID <sub>50</sub> in the first 1000µl aliquot
$X_k$	=	decadal logarithm of the first dilution where all parallels (here 8) are positive
$D$	=	decadal logarithm of the dilution factor (here 1)
$P_i$	=	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  $S_m$  is calculated according to the following formula

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

$S_m$	=	standard deviation of the logarithmic titre
$d$	=	decadal logarithm of the dilution factor (here 1)
$P_i$	=	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

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

#### 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.

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

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

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

## 6. Results

Incidin Active			
Parameter(s)		logarithmic reduction factor(s) incl. 95% confidence interval(s) against <i>Poliovirus</i> , 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  $\geq 4.0 \lg$ . 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<sub>10</sub>-TCID<sub>50</sub>/ml acc. Spearman & Kärber; P<sub>i</sub> = 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 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444400 P <sub>i</sub> = 0.250	00000000 P <sub>i</sub> = 0	7.25±0.33
	Incidin Active	w/o	0.002%	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444400 P <sub>i</sub> = 0.250	00000000 P <sub>i</sub> = 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	xxxxxxx	00000000	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	00000000	<0.50±0.00
WSH	dirty		00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	<0.50±0.00
Formaldehyde 0.75%	without		xxxxxxx	xxxxxxx	00000000	00000000	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	xxxxxxx	xxxxxxx	44444444	44444444	44440000	00000000	00000000	00000000	00000000	6.00±0.38	1.25±0.50
HCHO 0.7%	60	Not done	xxxxxxx	xxxxxxx	44444444	44444444	44440000	00000000	00000000	00000000	00000000	5.00±0.38	2.25±0.50
HCHO 0.7%	120	Not done	xxxxxxx	xxxxxxx	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	3.50±0.00	≥3.75±0.33
WSH	120	Not done	44444444	44444444	44444444	44444444	44444444	44444444	44444444	44444400	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	xxxxxxx Pi = 1	44444444 Pi = 1	44444444 Pi = 1	44444444 Pi = 1	44444444 Pi = 1	44444444 Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	44444440 Pi = 0.750	00000000 Pi = 0	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	xxxxxxx Pi = 1	44444444 Pi = 1	44444440 Pi = 0.875	00000000 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	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	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	xxxxxxx Pi = 1	44400000 Pi = 0.375	00000000 Pi = 0	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	00000000 Pi = 0	7.38±0.25	0.125









**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

## 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)

2.1. Product names	<b>Incidin Active</b>
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
2.1.9 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<sup>-9</sup>. 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) + 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

100 $\mu$ l Load

+100 $\mu$ l DMEM+2%FCS

+800 $\mu$ l Product (x1.25)

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

4.15 Performance controls with formaldehyde

100 $\mu$ l virus inoculum preparation

+400 $\mu$ l PBS

\*+500 $\mu$ l 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 100 $\mu$ l aliquots are withdrawn and transferred to ice-cold supplemented DMEM +2% FCS and serial 1:10 dilutions are prepared. 100 $\mu$ l 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 1000 $\mu$ l aliquots may be re-calculated as 50% infective dose (TCID<sub>50</sub>) by the method of *Spearman & Kärber*

$$m (\text{TCID}_{50}) = X_k + d/2 - d \cdot \sum p_i$$

- $m$  = negative decadal logarithm TCID<sub>50</sub> in the first 1000 $\mu$ l aliquot  
 $X_k$  = decadal logarithm of the first dilution where all parallels (here 8) are positive  
 $D$  = decadal logarithm of the dilution factor (here 1)  
 $P_i$  = 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  $S_m$  is calculated according to the following formula

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

- $S_m$  = standard deviation of the logarithmic titre  
 $d$  = decadal logarithm of the dilution factor (here 1)  
 $P_i$  = 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

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

### 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.

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

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

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

## 6. Results

Incidin Active			
Parameter(s)		logarithmic reduction factor(s) incl. 95% confidence interval(s) against <i>Poliovirus</i> , 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  $\geq 4.0$ lg. 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



**Table appendix**

**Interference controls on RD cells**

m = Titer as log<sub>10</sub>-TCID<sub>50</sub>/ml acc. Spearman & Kärber; P<sub>i</sub> = Ratio of positives in a series of parallels

assay	product	load	Product dilution	log dilution								incl. 95% confidence interval	m
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8		
Interference-control(s)	PBS	w/o	-	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44000000 P <sub>i</sub> = 0.250	00000000 P <sub>i</sub> = 0	6.75±0.33
	Incidin Active	w/o	0.002%	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44444444 P <sub>i</sub> = 1.0	44400000 P <sub>i</sub> = 0.375	00000000 P <sub>i</sub> = 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	00000000	<0.5±0.0
Incidin Active 0.5%	dirty	RD	00000000	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	00000000	<0.5±0.0
DMEM+5%FCS	dirty	RD	00000000	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	00000000	<0.5±0.0
Formaldehyde 0.75%	without	RD	xxxxxxx	xxxxxxx	xxxxxxx	xxxxxxx	xxxxxxx	xxxxxxx	xxxxxxx	xxxxxxx	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	Not done	xxxxxxx	xxxxxxx	44444444	44440000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	5.00±0.38	1.88±0.53
	Not done	xxxxxxx	xxxxxxx	44000000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	3.75±0.33	3.13±0.49
	Not done	xxxxxxx	xxxxxxx	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	3.50±0.00	3.38±0.37
WSH control	Not done	44444444	log dilution					Cell-control	m	m incl. 95% ci	log RF incl. 96%ci	
			-1	-2	-3	-4	-5					-6
120	Not done	44444444	44444444	44444444	44444444	44444444	44400000	00000000	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	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	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	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	44444400 Pi = 0.625	00000000 Pi = 0	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	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	44444444 Pi = 0.625	44444444 Pi = 0	44444444 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	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	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 <sub>50</sub> after ...					>4 log <sub>10</sub> 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	RF		RF			
				0.38±0.49	0.13±0.49		4.50±0.44			
Incidin active	0.5	dirty conditions	<0.5	6.88±0.37	6.63±0.25		5.13±0.37		Not sufficient within 60 min	
				RF	RF		RF			
				0.25±0.52	0.25±0.44		1.75±0.52			
WSH	0.1	dirty conditions	<0.5	6.88±0.37			6.75±0.33		Not sufficient within 60 min	
				RF			RF			
				0.25±0.52			0.13±0.49			
WSH control for formaldehyde	-	dirty conditions	<0.5	7.13±0.37	6.88±0.37		6.88±0.37			
Formaldehyde	0.75	-	3.5			5.00±0.38	3.75±0.33	6.88±0.37		Sufficient acc. EN14476
						RF	RF	RF	RF	
						1.88±0.53	3.13±0.49	≥3.38±0.37		

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

Product	Ac (%)	load	Log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml incl. 95% Confidence interval(s) after								RF incl. 95% Confidence interval(s) after						≥4 log <sub>10</sub> 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

**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	<b>Incidin Active</b>
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
2.1.9 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<sup>-9</sup>. 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) + 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 + 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

100 $\mu$ l Load

+100 $\mu$ l DMEM+5%FCS

+800 $\mu$ l Product (x1.25)

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

4.15 Performance controls with formaldehyde

100 $\mu$ l virus inoculum preparation

+400 $\mu$ l PBS

\*+500 $\mu$ l 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 100 $\mu$ l aliquots are withdrawn and transferred to ice-cold supplemented DMEM + 5% FCS and serial 1:10 dilutions are prepared. 100 $\mu$ l 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 1000 $\mu$ l aliquots may be re-calculated as 50% infective dose (TCID<sub>50</sub>) by the method of *Spearman & Kärber*

$$m \text{ (TCID}_{50}\text{)} = X_k + d/2 - d \cdot \sum p_i$$

- $m$  = negative decadal logarithm TCID<sub>50</sub> in the first 1000 $\mu$ l aliquot  
 $X_k$  = decadal logarithm of the first dilution where all parallels (here 8) are positive  
 $D$  = decadal logarithm of the dilution factor (here 1)  
 $P_i$  = 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  $S_m$  is calculated according to the following formula

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

- $S_m$  = standard deviation of the logarithmic titre  
 $d$  = decadal logarithm of the dilution factor (here 1)  
 $P_i$  = 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

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

### 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.

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

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

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



## 6. Results

Incidin Active			
Parameter(s)		logarithmic reduction factor(s) incl. 95% confidence interval(s) against <i>Murine Norovirus-S99</i> , 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  $\geq 4.0$ lg. 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



**Tab. 3 Formaldehyde control against *Murine Norovirus-S99, Berlin/06/DE* 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	30	Not done	xxxxxxx	xxxxxxx	44400000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	00000000	3.88±0.37	2.88±0.49
	60	Not done	xxxxxxx	xxxxxxx	44000000	00000000	00000000	00000000	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	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	xxxxxxx Pi = 1	44444444 Pi = 1	40000000 Pi = 0.125	00000000 Pi = 0	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	xxxxxxx Pi = 1	44444444 Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	xxxxxxx Pi = 1	44444444 Pi = 1	44444444 Pi = 1	00000000 Pi = 0	00000000 Pi = 0	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	xxxxxxx Pi = 1	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	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	xxxxxxx Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	xxxxxxx Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	xxxxxxx Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	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	xxxxxxx Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	xxxxxxx Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	xxxxxxx Pi = 1	00000000 Pi = 0	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	44444444 Pi = 1	44400000 Pi = 0.375	00000000 Pi = 0	6.88±0.37	0.183



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

Product	Ac (%)	load	Log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml incl. 95% Confidence interval(s) after						RF incl. 95% Confidence interval(s) after						≥4 log <sub>10</sub> 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							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		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		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								Sufficient acc. EN14476
Formaldehyde	0.75	-							3.88±0.37						RF 2.88±0.49	RF 3.00±0.46	Not applicable

IF = Interference control, DSA = disinfection suppressions assay



Sainghin en Mélantois, le 21 septembre 2017  
*Sainghin en Mélantois, on the September 21<sup>th</sup> 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 ( <i>Study Number</i> ) n° 35885	1
2. Sommaire ( <i>Summary</i> )	2
3. Introduction ( <i>Introduction</i> )	3
4. Identification de l'échantillon ( <i>Sample Identification</i> )	3
5. Méthode expérimentale ( <i>Experimental Method</i> )	4
5.1. Conditions expérimentales ( <i>Experimental conditions</i> )	4
5.2. Méthode par dilution neutralisation ( <i>Method by dilution neutralisation</i> )	4
6. Résultats ( <i>Results</i> )	5
6.1. Essais de validation des conditions expérimentales ( <i>Validation tests</i> )	5
6.2. Essais d'activité levuricide ( <i>Evaluation of yeasticidal activity</i> )	6
7. Conclusion ( <i>Conclusion</i> )	6
8. Annexe - Données expérimentales ( <i>Experimental Data</i> )	7

### 3. Introduction (*Introduction*)

L'essai a été réalisé selon la méthode d'essai décrite dans la norme européenne EN 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	<b>FC 913019</b>
<i>Code formula</i>	
Numéro d'identification de l'échantillon	<b>4661 17 08 13624</b>
<i>Identification of the sample</i>	
Numéro de lot	<b>2446FM0410</b>
<i>Batch number</i>	
Fabricant	<b>ECOLAB</b>
<i>Manufacturer</i>	
Date de réception au laboratoire	Le 31/07/17
<i>Receipt date at the laboratory</i>	<i>On the 31/07/17</i>
Conditions de stockage au laboratoire	T° ambiante et obscurité
<i>Storage conditions at the laboratory</i>	<i>Room temperature and darkness</i>
Substances actives	Solution à 20g/l : > 1000 ppm acide peracetique(CAS 79-21-0)
<i>Activ substances</i>	<i>Solution of 20g/l : &gt; 1000 ppm peracetic acid (CAS 79-21-0)</i>
Période d'essai	Du 04/08/17 au 07/08/17
<i>Period of analysis</i>	<i>From 04/08/17 to 07/08/17</i>



## 5. Méthode expérimentale (Experimental Method)

### 5.1. Conditions expérimentales (Experimental conditions)

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

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

Nature du neutralisant utilisé	○ Formule : F002
<i>Nature of the neutralizer agent used</i>	○ <i>Formula : F002</i>
Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement	10%
<i>Neutralizer agent added to the counting medium</i>	<i>10%</i>

## 6. Résultats (Results)

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

Vérification de la méthodologie et validation de la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **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.*

Souche testée	Nombre de cellules viables (UFC/ml) (Number of viable cells(CFU/ml))							
	Suspension d'essai	Suspension d'essai / 10	Suspension de validation	Suspension de validation / 10	Suspension de validation B	Validation conditions expérimentales	Non toxicité du neutralisant	Inactivation par dilution neutralisation
<i>Tested strain</i>	<i>Test suspension</i>	<i>Test suspension / 10</i>	<i>Validation suspension</i>	<i>Validation suspension / 10</i>	<i>Validation suspension B</i>	<i>Experimental conditions control</i>	<i>Neutralizer toxicity control</i>	<i>Dilution neutralization control</i>
	<i>N</i>	<i>N<sub>0</sub></i>	<i>N<sub>v</sub></i>	<i>N<sub>v0</sub></i>	<i>N<sub>vB</sub></i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<b>Candida albicans</b>	$1,5 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^2$	$3,3 \cdot 10^1$	$3,5 \cdot 10^4$	$2,8 \cdot 10^1$	$3,1 \cdot 10^1$	$3,6 \cdot 10^1$

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

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

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

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

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

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

La neutralisation est validée avec la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **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
<b>Candida albicans</b>	$>3,3.10^4$	$>3,3.10^4$	$<1,4.10^2$

	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
<b>Candida albicans</b>	$< 1,7$	$< 1,7$	$\geq 4,1$

## 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

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

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

Nv	C	$\frac{650}{2}$	=	3,3E+02	N <sub>0</sub> =	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

Dénombrement de la suspension bactérienne:

Souche	Dénombrement : 14 à 330 UFC/boîte			
	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 boîtes considérées..... 337  
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution ..... 2  
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution ..... 2  
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte : .....10<sup>5</sup>

Moyenne pondérée :  $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{337}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^5} = 1,5E+07$  UFC/ml N<sub>0</sub>=N<sub>10</sub>= 1,5E+06

Interprétation :

N est compris entre 1,5.10<sup>7</sup> UFC/ml et 5.10<sup>7</sup> UFC/ml 1,5E+07 Oui  
Nv est compris entre 3.10<sup>2</sup> et 1,6.10<sup>3</sup> 3,3E+02 Oui  
NvB est compris entre 3.10<sup>4</sup> et 1,6.10<sup>5</sup> 3,5E+04 Oui  
Nv0 est compris entre 3.10<sup>1</sup> et 1,6.10<sup>2</sup> 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

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

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

	14 à 330 UFC/boîte		14 à 330 UFC/boîte		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				
Nv : témoin suspension	38	27	38	27	Concentration produit %		0,01	0,1	1						
NvB : témoin suspension B	35	35	35	35	Lecture intermédiaire 20 à 24 heures de 14 à 330 UFC par boîte	0	+	+	+	+	2	6			
	35	35	35	35		-1	+	+	+	+	0	0			
A : témoin des conditions expérimentales	28	27	28	27	Lecture 42 à 48 heures de 14 à 330 UFC par boîte	0	+	+	+	+	2	6			
	31	31	31	31		-1	+	+	+	+	0	0			
B : témoin de non-toxicité du neutralisant	34	37	34	37											
	34	37	34	37											
C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 1 %															
Lecture intermédiaire 20 à 24 heures		Lecture 42 à 48 heures		Na = $\frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$		>	3,3E+04	>	3,3E+04	<	1,4E+02				
Calculs Nv = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml). N <sub>0</sub> , A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml).				Log N0 = 6,2		Log Na = 4,5		4,5		2,1					
NvB = $\frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml).				Calcul de réduction = Log N <sub>0</sub> - Log Na = Log R		<		1,7		<		1,7 >		4,1	

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

SUITE A DONNER :  
VISA : **Conforme**

# Direction Scientifique

## Liste des signataires du document



Nom\_utilisateur : 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  
=====

Sainghin en Mélantois, le 27 mars 2018

*Sainghin en Mélantois, on the March 27<sup>th</sup> 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 ( <i>Study Number</i> ) n° 36772	1
2. Sommaire ( <i>Summary</i> )	2
3. Introduction ( <i>Introduction</i> )	3
4. Identification de l'échantillon ( <i>Sample Identification</i> )	3
5. Méthode expérimentale ( <i>Experimental Method</i> )	4
5.1. Conditions expérimentales ( <i>Experimental conditions</i> )	4
5.2. Méthode par dilution neutralisation ( <i>Method by dilution neutralisation</i> )	4
6. Résultats ( <i>Results</i> )	5
6.1. Essais de validation des conditions expérimentales ( <i>Validation tests</i> )	5
6.2. Essais d'activité fongicide ( <i>Evaluation of fungicidal activity</i> )	6
7. Conclusion ( <i>Conclusion</i> )	6
8. Annexe - Données expérimentales ( <i>Experimental Data</i> )	7

### 3. Introduction (*Introduction*)

L'essai a été réalisé selon la méthode d'essai décrite dans la norme européenne EN 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	<b>FC 913019</b>
<i>Code formula</i>	
Numéro d'identification de l'échantillon	<b>0408 18 01 13624</b>
<i>Identification of the sample</i>	
Numéro de lot	<b>2446 FM 0410</b>
<i>Batch number</i>	
Fabricant	<b>ECOLAB</b>
<i>Manufacturer</i>	
Date de réception au laboratoire	Le 31/07/17
<i>Receipt date at the laboratory</i>	<i>On the 31/07/17</i>
Conditions de stockage au laboratoire	T° ambiante et obscurité
<i>Storage conditions at the laboratory</i>	<i>Room temperature and darkness</i>
Substances actives	Solution à 20g/l : > 1000 ppm acide peracétique(CAS 79-21-0)
<i>Activ substances</i>	<i>Solution of 20g/l : &gt; 1000 ppm peracetic acid (CAS 79-21-0)</i>
Période d'essai	Du 22/01/18 au 02/02/18
<i>Period of analysis</i>	<i>From 22/01/18 to 02/02/18</i>

## 5. Méthode expérimentale (Experimental Method)

### 5.1. Conditions expérimentales (Experimental conditions)

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

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

Nature du neutralisant utilisé	○ Formule : F002
<i>Nature of the neutralizer agent used</i>	○ <i>Formula : F002</i>
Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement	10%
<i>Neutralizer agent added to the counting medium</i>	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
<i>Tested strain</i>	<i>Test suspension</i>	<i>Test suspension / 10</i>	<i>Validation suspension</i>	<i>Validation suspension / 10</i>	<i>Validation suspension B</i>	<i>Experimental conditions control</i>	<i>Neutralizer toxicity control</i>	<i>Dilution neutralization control</i>
	<i>N</i>	<i>N<sub>0</sub></i>	<i>N<sub>v</sub></i>	<i>N<sub>v0</sub></i>	<i>N<sub>vB</sub></i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<b>Aspergillus brasiliensis</b>	$1,9 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^2$	$4,2 \cdot 10^1$	$4,2 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^1$	$4,1 \cdot 10^1$	$4,3 \cdot 10^1$

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

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

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

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

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

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

La neutralisation est validée avec la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **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
<b>Aspergillus brasiliensis</b>	$>1,7.10^4$	$>1,7.10^4$	$<1,4.10^2$

	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
<b>Aspergillus brasiliensis</b>	< 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

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

Numéro d'identification: **0408 18 01 13624**

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			

Nv	C	$\frac{830}{2}$	=	4,2E+02	N <sub>v0</sub>	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

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 421 ..... N est compris entre 1,5.10<sup>7</sup> UFC/ml et 5.10<sup>7</sup> UFC/ml 1,9E+07 Oui  
 n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution ..... 2 ..... Nv est compris entre 3.10<sup>2</sup> et 1,6.10<sup>3</sup> 4,2E+02 Oui  
 n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution ..... 2 ..... NvB est compris entre 3.10<sup>4</sup> et 1,6.10<sup>5</sup> 4,2E+04 Oui  
 d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte : .....10<sup>-5</sup> ..... Nv0 est compris entre 3.10<sup>1</sup> et 1,6.10<sup>2</sup> 4,2E+01 Oui  
 Moyenne pondérée :  $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{421}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^5} = 1,9E+07$  UFC/ml N0=N/10= 1,9E+06 4,2E+01 et 4,3E+01 Oui  
 A et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nv0 4,1E+01 Oui  
 B est supérieur ou égal à 0,0005 x NvB 4,1E+01 Oui

Interprétation :

N est compris entre 1,5.10<sup>7</sup> UFC/ml et 5.10<sup>7</sup> UFC/ml 1,9E+07 Oui  
 Nv est compris entre 3.10<sup>2</sup> et 1,6.10<sup>3</sup> 4,2E+02 Oui  
 NvB est compris entre 3.10<sup>4</sup> et 1,6.10<sup>5</sup> 4,2E+04 Oui  
 Nv0 est compris entre 3.10<sup>1</sup> et 1,6.10<sup>2</sup> 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

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

Essai de validation :

Temps de contact : **TL 60'**

Essai :

Temps de contact : **TL 60'**

	14 à 165 UFC/boîte		14 à 165 UFC/boîte		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		
Nv : témoin suspension	17	20	17	20	Concentration produit %	0,1		0,5		1		
	24	22	24	22		0	+	+	+	+	3	3
NvB : témoin suspension B	24	16	24	16	Lecture 42 à 48 heures de 14 à 165 UFC par boîte	-1	+	+	+	+	0	0
	22	21	22	21								
A : témoin des conditions expérimentales	39		39		Lecture 62 à 72 heures de 14 à 165 UFC par boîte	0	+	+	+	+	3	3
	44		44			-1	+	+	+	+	0	0
B : témoin de non-toxicité du neutralisant	42		42									
	40		40									
C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation	38		38									
à 1 %	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)		$Na = \frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$	>	1,7E+04	>	1,7E+04	<	1,4E+02	
	$NvB = \frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml)				Log N0 = 6,3		Log Na = 4,2		4,2		2,1	
					Calcul de réduction = Log N <sub>0</sub> - Log Na = Log R	<	2,1	<	2,1	>	4,2	

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

SUITE A DONNER :  
VISA : **Conforme**

# Direction Scientifique

## Liste des signataires du document



Nom\_utilisateur : 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  
=====



Sainghin en Mélantois, le 09 avril 2018  
*Sainghin en Mélantois, on the April 09<sup>th</sup> 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.*

## 2. Sommaire (Summary)

1. Objet de la demande ( <i>Study Number</i> ) n° 36828	1
2. Sommaire ( <i>Summary</i> )	2
3. Introduction ( <i>Introduction</i> )	3
4. Identification de l'échantillon ( <i>Sample Identification</i> )	3
5. Méthode expérimentale ( <i>Experimental Method</i> )	4
5.1. Conditions expérimentales ( <i>Experimental conditions</i> )	4
5.2. Méthode par dilution neutralisation ( <i>Method by dilution neutralisation</i> )	4
6. Résultats ( <i>Results</i> )	5
6.1. Essais de validation des conditions expérimentales ( <i>Validation tests</i> )	5
6.2. Essais d'activité fongicide ( <i>Evaluation of fungicidal activity</i> )	6
7. Conclusion ( <i>Conclusion</i> )	6
8. Annexe - Données expérimentales ( <i>Experimental Data</i> )	7

### 3. Introduction (Introduction)

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

## 5. Méthode expérimentale (Experimental Method)

### 5.1. Conditions expérimentales (Experimental conditions)

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

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

Nature du neutralisant utilisé	○ Formule : F002
<i>Nature of the neutralizer agent used</i>	○ <i>Formula : F002</i>
Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement	10%
<i>Neutralizer agent added to the counting medium</i>	<i>10%</i>



## 6. Résultats (Results)

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

Vérification de la méthodologie et validation de la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **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 <sub>0</sub>	N <sub>v</sub>	N <sub>v0</sub>	N <sub>vB</sub>	A	B	C
<b>Aspergillus brasiliensis</b>	3,3.10 <sup>7</sup>	3,3.10 <sup>6</sup>	6,4.10 <sup>2</sup>	6,4.10 <sup>1</sup>	6,0.10 <sup>4</sup>	6,0.10 <sup>1</sup>	7,0.10 <sup>1</sup>	5,4.10 <sup>1</sup>

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

N est compris entre 1,5 x 10<sup>7</sup> UFC/ml et 5 x 10<sup>7</sup> UFC/ml  
is comprised between 1.5 x 10<sup>7</sup> CFU/ml and 5 x 10<sup>7</sup> CFU/ml

N<sub>0</sub> est compris entre 1,5 x 10<sup>6</sup> UFC/ml et 5 x 10<sup>6</sup> UFC/ml  
is comprised between 1.5 x 10<sup>6</sup> CFU/ml and 5 x 10<sup>6</sup> CFU/ml

N<sub>v</sub> est compris entre 3 x 10<sup>2</sup> UFC/ml et 1.6 x 10<sup>3</sup> UFC/ml  
is comprised between 3 x 10<sup>2</sup> CFU/ml and 1.6 x 10<sup>3</sup> CFU/ml

N<sub>v0</sub> est compris entre 3 x 10<sup>1</sup> UFC/ml et 1.6 x 10<sup>2</sup> UFC/ml  
is comprised between 3 x 10<sup>1</sup> CFU/ml and 1.6 x 10<sup>2</sup> CFU/ml

N<sub>vB</sub> est compris entre 3 x 10<sup>4</sup> UFC/ml et 1.6 x 10<sup>5</sup> UFC/ml  
is comprised between 3 x 10<sup>4</sup> CFU/ml and 1.6 x 10<sup>5</sup> CFU/ml

B est supérieur ou égal à 0,0005 x N<sub>vB</sub>  
are higher or equal to 0,0005 x N<sub>vB</sub>

A,C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x N<sub>v0</sub>  
are higher or equal to 0.5 x N<sub>v0</sub>

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
<b>Aspergillus brasiliensis</b>	$>1,7.10^4$	$7,4.10^3$	$<1,4.10^2$

	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
<b>Aspergillus brasiliensis</b>	< 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

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**

Numéro d'identification: **2185 18 04 13624**

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					

Nv	C	$\frac{1280}{2}$	=	6,4E+02	N <sub>0</sub> =	6,4E+01	UFC/mL
NvB	C	$\frac{120000}{2}$	=	6,0E+04			
A	C	$\frac{119}{2}$	=	6,0E+01			
B	C	$\frac{139}{2}$	=	7,0E+01			
C	C	$\frac{108}{2}$	=	5,4E+01			

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 66  
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution ..... 0  
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution ..... 2  
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte : ..... 10<sup>6</sup>

Moyenne pondérée :  $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{66}{(0 + 0,1 \times 2) \times 10^6} = 3,3E+07$  UFC/ml      N<sub>0</sub>=N<sub>10</sub>= 3,3E+06

Interprétation :

N est compris entre 1,5.10 <sup>7</sup> UFC/ml et 5.10 <sup>7</sup> UFC/ml	3,3E+07	Oui
Nv est compris entre 3.10 <sup>2</sup> et 1,6.10 <sup>3</sup>	6,4E+02	Oui
NvB est compris entre 3.10 <sup>0</sup> et 1,6.10 <sup>5</sup>	6,0E+04	Oui
Nv0 est compris entre 3.10 <sup>1</sup> et 1,6.10 <sup>2</sup>	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

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

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

	14 à 165 UFC/boîte		14 à 165 UFC/boîte		Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml	dilution 1/2 de la fiole 1,25%	Pesée 1,25g		Pesée 2,5g			
Nv : témoin suspension	30	31	30	31	Concentration produit %	0,5	1		2			
	32	35	32	35			0	+	+	+	+	0
NvB : témoin suspension B	26	32	26	32	Lecture 42 à 48 heures de 14 à 165 UFC par boîte	-1	+	+	68	79	0	0
	34	28	34	28								
A : témoin des conditions expérimentales	64		64		Lecture 62 à 72 heures de 14 à 165 UFC par boîte	-1	+	+	68	79	0	0
	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							
					$N_a = \frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$		>	1,7E+04	7,4E+03	<	1,4E+02	
					Log N <sub>0</sub> = 6,5		Log N <sub>a</sub> =		4,2	3,9	2,1	
					Calcul de réduction = Log N <sub>0</sub> - Log N <sub>a</sub> = Log R		<	2,3	2,6	>	4,4	

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

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

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

SUITE A DONNER :  
VISA : **Conforme**

# Direction Scientifique

## Liste des signataires du document



Nom\_utilisateur : 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

---



Sainghin en Mélançois, le 21 septembre 2017  
*Sainghin en Mélançois, on the September 21<sup>th</sup> 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.*

## 2. Sommaire (*Summary*)

1. Objet de la demande ( <i>Study Number</i> ) n° 35886	1
2. Sommaire ( <i>Summary</i> )	2
3. Introduction ( <i>Introduction</i> )	3
4. Identification de l'échantillon ( <i>Sample Identification</i> )	3
5. Méthode expérimentale ( <i>Experimental Method</i> )	4
5.1. Conditions expérimentales ( <i>Experimental conditions</i> )	4
5.2. Méthode par dilution neutralisation ( <i>Method by dilution neutralisation</i> )	4
6. Résultats ( <i>Results</i> )	5
6.1. Essais de validation des conditions expérimentales ( <i>Validation tests</i> )	5
6.2. Essais d'activité bactéricide ( <i>Evaluation of bactericidal activity</i> )	6
7. Conclusion ( <i>Conclusion</i> )	6
8. Annexe - Données expérimentales ( <i>Experimental Data</i> )	7

### 3. Introduction (Introduction)

L'essai a été réalisé selon la méthode d'essai 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	<b>FC 913019</b>
Code formula	
Numéro d'identification de l'échantillon	<b>4572 17 08 13697</b>
Identification of the sample	
Numéro de lot	<b>2446FM0410</b>
Batch number	
Fabricant	<b>ECOLAB</b>
Manufacturer	
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	Solution à 20g/l : > 1000 ppm acide peracetique(CAS 79-21-0)
Activ substances	Solution of 20g/l : > 1000 ppm peracetic acid (CAS 79-21-0)
Période d'essai	Du 01/08/17 au 03/08/17
Period of analysis	From 01/08/17 to 03/08/17

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

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

Température de l'essai <i>Test temperature</i>	18 à 25°C ± 1°C
Temps de contact <i>Contact Time</i>	<b>5 minutes</b> ± 10s
Nature du support <i>Nature of the carrier</i>	Inox <i>Stainless Steel</i>
Diluant de la formule lors des essais <i>Diluent of the formula used during the test</i>	Eau dure <i>Hard water</i>
Apparence de la formule et de ses dilutions <i>Appearance formula dilutions</i>	Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai <i>Preparation physically homogeneous and stable during test</i>
Souches testées <i>Tested strains</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ <b>Pseudomonas aeruginosa</b> CIP 103467 (équivalent ATCC 15442)</li><li>○ <b>Escherichia coli</b> CIP 54127 (équivalent ATCC 10536)</li><li>○ <b>Enterococcus hirae</b> CIP 5855 (équivalent ATCC 10541)</li><li>○ <b>Staphylococcus aureus</b> CIP 483 (équivalent ATCC 6538)</li></ul>
Substance interférente <i>Interfering substance</i>	Albumine bovine à 3g/l <i>3 g/l BSA</i>
Stabilité du mélange formule et substances interférentes <i>Stability of the mixture (formula and interfering substance)</i>	Absence de précipité pendant l'essai <i>Precipitate absent throughout the test</i>
Température d'incubation <i>Incubation temperature</i>	37°C ± 1°C <i>37°C ± 1°C</i>

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

Nature du neutralisant utilisé <i>Nature of the neutralizer agent used</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Formule : F002</li><li>○ <i>Formula : F002</i></li></ul>
Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement <i>Neutralizer agent added to the counting medium</i>	∅ <i>∅</i>



## 6. Résultats (Results)

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

Vérification de la méthodologie et validation de la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **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
<i>Tested strains</i>	<i>Test suspension</i>	<i>Experimental conditions control</i>	<i>Neutralizer toxicity control</i>	<i>Method validation</i>
	<i>N</i>	<i>Nc</i>	<i>NC</i>	<i>NT</i>
<b>Pseudomonas aeruginosa CIP 103467 (équivalent</b>	6,57	6,48	6,45	6,46
<b>Escherichia coli CIP 54127 (équivalent ATCC 10536)</b>	6,60	6,46	6,49	6,43
<b>Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC 10541)</b>	6,86	6,86	6,69	6,72
<b>Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent ATCC</b>	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  $\pm 0.3$  - *NT is  $>$  at  $0.5 Nc$  and is not higher than  $\pm 0.3$*

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
<b>Pseudomonas aeruginosa CIP 103467</b>	3,88	<2,15	<0,10
<b>Escherichia coli CIP 54127 (équivalent)</b>	4,97	<0,10	<0,10
<b>Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC)</b>	>5,52	<0,10	<0,10
<b>Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent)</b>	>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
<b>Pseudomonas aeruginosa CIP 103467</b>	2,60	<u>&gt; 4,33</u>	<u>&gt; 6,38</u>
<b>Escherichia coli CIP 54127 (équivalent)</b>	1,49	<u>&gt; 6,36</u>	<u>&gt; 6,36</u>
<b>Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC)</b>	< 1,34	<u>&gt; 6,76</u>	<u>&gt; 6,76</u>
<b>Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent)</b>	< 1,34	<u>4,68</u>	<u>&gt; 6,76</u>

## 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

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**

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

Essai proprement dit :

Temps de contact : **KP**

**5'**

Dénombrement de la suspension bactérienne:

Souche	Dénombrement : 14 à 330 colonies/boîte			
	Dilution - 6	Dilution - 7	Dilution - 6	Dilution - 7
Pseudomonas aeruginosa CIP 103467 (équivalent ATCC 15442)	141	15	141	15
	150	18	150	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'**

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

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**

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

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**

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

**Dénombrement de la suspension bactérienne:**

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

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

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

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'**

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

m, m' : répliqués de la plus faible dilution, exprimés en UFC  
n, n' : répliqués 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 :

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 neutralisant  
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**



# 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

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**

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

Dénombrement de la suspension bactérienne:

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

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'**


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

Volume pipeté de produit pour fiole 100mL (mL)	Concentrations (%)	0	-1	-2	Nts	Nd = $\log (( m + m' + n + n' ) / 2,2 \times V \times d)$	
		0,01	0,01	24h	+		+
+	+	+	+	+	27		
48h	+	+	+	+	+	27	
0,1	0,1	24h	0	0	0	0	$Nd = \log ( 28 ) / 2 \times 10 / 10^0 = < 0,10$
		0	0	0	0	0	
48h	0	0	0	0	0		
1	1	24h	0	0	0	0	$Nd = \log ( 28 ) / 2 \times 10 / 10^0 = < 0,10$
		0	0	0	0	0	
48h	0	0	0	0	0		
		24h					=
48h							

m, m' : répliqués de la plus faible dilution, exprimés en UFC  
n, n' : répliqués de la plus forte 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 :

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 par 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**

*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

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 CP 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	$Nc; NT; NC = \log \left( \frac{c \times 10}{n \times d} \right)$
c	24h	+	66	5	1	28	$Nc = \log (143) / 2 \times 10/10^{-4} = 6,86$
	48h	+	66	5	1	28	$Nc \cdot 6,27 \text{ logs}$ <b>Conforme</b>
C	24h	+	56	6			$NC = \log (109) / 2 \times 10/10^{-4} = 6,74$
	48h	+	56	6			$NC > 0,5 Nc$ <b>Conforme</b>
T	24h	+	68	10			$NT = \log (139) / 2 \times 10/10^{-4} = 6,85$
	48h	+	68	10			$NT > 0,5 Nc$ <b>Conforme</b>

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 par 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**

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

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

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

m, m' : répliqués de la plus faible dilution, exprimés en UFC  
n, n' : répliqués 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  
=====

Sainghin en Mélantois, le 21 septembre 2017  
*Sainghin en Mélantois, on the September 21<sup>th</sup> 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

Version E du 21/09/2017



## 2. Sommaire (*Summary*)

1. Objet de la demande ( <i>Study Number</i> ) n° 35956	1
2. Sommaire ( <i>Summary</i> )	2
3. Introduction ( <i>Introduction</i> )	3
4. Identification de l'échantillon ( <i>Sample Identification</i> )	3
5. Méthode expérimentale ( <i>Experimental Method</i> )	4
5.1. Conditions expérimentales ( <i>Experimental conditions</i> )	4
5.2. Méthode par dilution neutralisation ( <i>Method by dilution neutralisation</i> )	4
6. Résultats ( <i>Results</i> )	5
6.1. Essais de validation des conditions expérimentales ( <i>Validation tests</i> )	5
6.2. Essais d'activité levuricide ( <i>Evaluation of yeastocidal activity</i> )	6
7. Conclusion ( <i>Conclusion</i> )	6
8. Annexe - Données expérimentales ( <i>Experimental Data</i> )	7

### 3. Introduction (Introduction)

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

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

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

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

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

Nature du neutralisant utilisé <i>Nature of the neutralizer agent used</i>	○ Formule : F002 <i>○ Formula : F002</i>
Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement <i>Neutralizer agent added to the counting medium</i>	∅ <i>∅</i>

## 6. Résultats (Results)

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

Vérification de la méthodologie et validation de la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de **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
<i>Tested strain</i>	<i>Test suspension</i>	<i>Experimental conditions control</i>	<i>Neutralizer toxicity control</i>	<i>Method validation</i>
	<i>N</i>	<i>Nc</i>	<i>NC</i>	<i>NT</i>
<b>Candida albicans</b>	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  $\pm 0.3$  - *NT is  $>$  at  $0.5 Nc$  and is not higher than  $\pm 0.3$*

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
<b>Candida albicans</b>	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
<b>Candida albicans</b>	1,09	2,94	<u>≥ 5,58</u>

## 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 (fongicide) Juin 2015

Réf : FS125S  
Date : 05/10/15

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

Réf : FS125S  
Date : 05/10/15

Date: 02.08.17

Numéro d'identification: 4589 17 08 13697

Dénombrement de la suspension fongique :

Numéro d'identification: 4589 17 08 13697

Temps de contact : KP 5'

Essai proprement dit :

Souche	Dénombrement : 14 à 330 colonies/boîte				Volume pipeté de produit pour fiole 100mL (mL)	Concentrations (%)	0	-1	-2	Nts	Nd = log ((m + m' + n + n') / 2,2 x V x d)
	Dilution - 5	Dilution - 6	Dilution - 5	Dilution - 6							
Candida albicans DSM 1386 (équivalent ATCC 10231)	241	26	241	26	0,01	0,01	0	-	-	0	Nd = log ( 77 ) / 2 x 10 / 10 <sup>-2</sup> = 4,59
	239	24	239	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							$Nc = \log ( 96 ) / 2 \times 10 / 10^{-3} = 5,68$	1	1	24h	+	+	37	0	Nd = log ( 77 ) / 2 x 10 / 10 <sup>-2</sup> = < 0,10
						$Nc \cdot 5,27 \text{ logs}$	24h			+	+	40	0		
						Conforme	48h			+	+	37	0		
C							$NC = \log ( 120 ) / 2 \times 10 / 10^{-3} = 5,78$			24h					Nd = log ( 28 ) / 2 x 10 / 10 <sup>0</sup> =
						$NC > 0,5 Nc$	24h								
						Conforme	48h								
T							$NT = \log ( 110 ) / 2 \times 10 / 10^{-3} = 5,74$			24h					Nd = log ( 28 ) / 2 x 10 / 10 <sup>0</sup> =
						$NT > 0,5 Nc$	24h								
						Conforme	48h								

m, m' : répliquats de la plus faible dilution, exprimés en UFC  
 n, n' : répliquats 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 =	-	-	-	=	

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 par surface d'essai du témoin 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

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  
=====

Sainghin en Mélantois, le 21 septembre 2017  
*Sainghin en Mélantois, on the September 21<sup>th</sup> 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

Version F du 21/09/2017

## 2. Sommaire (Summary)

1. Objet de la demande ( <i>Study Number</i> ) n° 35902	1
2. Sommaire ( <i>Summary</i> )	2
3. Introduction ( <i>Introduction</i> )	3
4. Identification de l'échantillon ( <i>Sample Identification</i> )	3
5. Méthode expérimentale ( <i>Experimental Method</i> )	4
5.1. Conditions expérimentales ( <i>Experimental conditions</i> )	4
5.2. Méthode par dilution neutralisation ( <i>Method by dilution neutralisation</i> )	4
6. Résultats ( <i>Results</i> )	5
6.1. Essais de validation des conditions expérimentales ( <i>Validation tests</i> )	5
6.2. Essais d'activité sporicide ( <i>Evaluation of sporicidal activity</i> )	6
7. Conclusion (Conclusion)	6
8. Annexe - Données expérimentales ( Experimental Data )	7

### 3. Introduction (*Introduction*)

L'essai a été réalisé selon la méthode d'essai décrite dans la norme européenne EN 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	<b>FC 913019</b>
<i>Code formula</i>	
Numéro d'identification de l'échantillon	<b>4755 17 08 13704</b>
<i>Identification of the sample</i>	
Numéro de lot	<b>2446FM0410</b>
<i>Batch number</i>	
Fabricant	<b>ECOLAB</b>
<i>Manufacturer</i>	
Date de réception au laboratoire	Le 31/07/17
<i>Receipt date at the laboratory</i>	<i>On the 31/07/17</i>
Conditions de stockage au laboratoire	T° ambiante et obscurité
<i>Storage conditions at the laboratory</i>	<i>Room temperature and darkness</i>
Substances actives	Solution à 20g/l : > 1000 ppm acide peracétique(CAS 79-21-0)
<i>Activ substances</i>	<i>Solution of 20g/l : &gt; 1000 ppm peracetic acid (CAS 79-21-0)</i>
Période d'essai	Du 08/08/17 au 11/08/17
<i>Period of analysis</i>	<i>From 08/08/17 to 11/08/17</i>



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

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

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

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

Nature du neutralisant utilisé	○ Formule : F002
<i>Nature of the neutralizer agent used</i>	○ <i>Formula : F002</i>
Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement	10%
<i>Neutralizer agent added to the counting medium</i>	<i>10%</i>

## 6. Résultats (Results)

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

Vérification de la méthodologie et validation de la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de 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
<i>Tested strain</i>	<i>Test suspension</i>	<i>Validation suspension</i>	<i>Experimental conditions control</i>	<i>Neutralizer toxicity control</i>	<i>Dilution neutralization control</i>
	<i>N</i>	<i>N<sub>v</sub></i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<b>Bacillus subtilis CIP 5262 (équivalent ATCC 6633)</b>	2,2.10 <sup>6</sup>	6,4.10 <sup>2</sup>	7,8.10 <sup>2</sup>	7,1.10 <sup>2</sup>	7,1.10 <sup>2</sup>

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

**N** est compris entre  $1,5 \times 10^6$  UFC/ml et  $5 \times 10^6$  UFC/ml

*Is comprised between  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml and  $5 \times 10^6$  CFU/ml*

**N<sub>v</sub>** est compris entre  $6,0 \times 10^2$  UFC/ml et  $3,0 \times 10^3$  UFC/ml

*is comprised between  $6,0 \times 10^2$  CFU/ml and  $3,0 \times 10^3$  CFU/ml*

**A** est supérieur ou égal à  $0,05 \times N_v$

*is higher or equal to  $0,05 \times N_v$*

**B** est supérieur ou égal à  $0,05 \times N_v$

*is higher or equal to  $0,05 \times N_v$*

**C** est supérieur ou égal à  $0,5 \times B$

*is higher or equal to  $0,5 \times B$*

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
<b>Bacillus subtilis CIP 5262 (équivalent)</b>	$>3,0.10^3$	$<1,7.10^2$	$<1,5.10^2$

	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
<b>Bacillus subtilis CIP 5262 (équivalent)</b>	$<7,3.10^1$	$>1,3.10^3$	$>1,5.10^3$

## 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 1850  
Date : 20/10/15

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

Réf : FS 1850  
Date : 20/10/15

Date: **08.08.17**

Réd: **3 log**

Numéro d'identification : **4755 17 08 13704**

Numéro d'identification : **4755 17 08 13704**

#### Dénombrement de la suspension microbienne :

Souche	Dénombrement : 15 à 300 colonies/boîte			
	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	

N <sub>v</sub>	C	$\frac{128}{2 \times 0,1 \times 1}$	=	6,4E+02	UFC/mL
A	C	$\frac{156}{2 \times 0,1 \times 1}$	=	7,8E+02	UFC/mL
B	C	$\frac{141}{2 \times 0,1 \times 1}$	=	7,1E+02	UFC/mL
C	C	$\frac{142}{2 \times 0,1 \times 1}$	=	7,1E+02	UFC/mL

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<sup>4</sup>

N est compris entre 1,5.10<sup>6</sup> UFC/ml et 5.10<sup>6</sup> UFC/ml ..... 2,2E+06 ..... Oui  
N<sub>v</sub> est compris entre 6.10<sup>2</sup> et 3.10<sup>3</sup> ..... 6,4E+02 ..... Oui  
A est supérieur ou égal à 0,05 x N<sub>v</sub> ..... 7,8E+02 ..... Oui  
B est supérieur ou égal à 0,05 x N<sub>v</sub> ..... 7,1E+02 ..... Oui  
C est supérieur ou égal à 0,5 x B ..... 7,1E+02 ..... Oui

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

La neutralisation est validée : **Oui**

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

Temps de contact : **FH 15'**

	De 15 à 300 UFC/boîte	De 15 à 300 UFC/boîte
N <sub>v</sub> : témoin suspension	64	64
A : témoin des conditions expérimentales	82	82
B : témoin de non-toxicité du neutralisant	73	73
C : essai de l'inactivation par dilution/neutralisation à 2 %	70	70
	72	72
	Lecture intermédiaire à 48 heures	Dénombrement à 72 heures

#### Essai :

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

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

R = Réduction du nombre de cellules viables = ( N x 10<sup>3</sup> ) / Na

C : somme des colonies dénombrées sur les deux boites.  
n : nombre de boites considérées.  
d : facteur de dilution : 10<sup>4</sup>  
v : volume de l'échantillon : 1ml.

	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

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

Page 3/4

Page 4/4

# 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  
=====



Sainghin en Mélantois, le 21 septembre 2017  
*Sainghin en Mélantois, on the September 21<sup>th</sup> 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.*

## 2. Sommaire (Summary)

1. Objet de la demande ( <i>Study Number</i> ) n° 35896	1
2. Sommaire ( <i>Summary</i> )	2
3. Introduction ( <i>Introduction</i> )	3
4. Identification de l'échantillon ( <i>Sample Identification</i> )	3
5. Méthode expérimentale ( <i>Experimental Method</i> )	4
5.1. Conditions expérimentales ( <i>Experimental conditions</i> )	4
5.2. Méthode par dilution neutralisation ( <i>Method by dilution neutralisation</i> )	4
6. Résultats ( <i>Results</i> )	5
6.1. Essais de validation des conditions expérimentales ( <i>Validation tests</i> )	5
6.2. Essais d'activité bactéricide ( <i>Evaluation of bactericidal activity</i> )	6
7. Conclusion ( <i>Conclusion</i> )	6
8. Annexe - Données expérimentales ( <i>Experimental Data</i> )	7

### 3. Introduction (*Introduction*)

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

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

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

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

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

Code formule	<b>FC 913019</b>
<i>Code formula</i>	
Numéro d'identification de l'échantillon	<b>4573 17 08 13727</b>
<i>Identification of the sample</i>	
Numéro de lot	<b>2446FM0410</b>
<i>Batch number</i>	
Fabricant	<b>ECOLAB</b>
<i>Manufacturer</i>	
Date de réception au laboratoire	Le 31/07/17
<i>Receipt date at the laboratory</i>	<i>On the 31/07/17</i>
Conditions de stockage au laboratoire	T° ambiante et obscurité
<i>Storage conditions at the laboratory</i>	<i>Room temperature and darkness</i>
Substances actives	Solution à 20g/l : > 1000 ppm acide peracétique(CAS 79-21-0)
<i>Activ substances</i>	<i>Solution of 20g/l : &gt; 1000 ppm peracetic acid (CAS 79-21-0)</i>
Période d'essai	Du 01/08/17 au 03/08/17
<i>Period of analysis</i>	<i>From 01/08/17 to 03/08/17</i>

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

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

Température de l'essai <i>Test temperature</i>	20°C ± 1°C
Temps de contact <i>Contact Time</i>	<b>5 minutes</b> ± 10s
Diluant de la formule lors des essais <i>Diluent of the formula used during the test</i>	Eau dure <i>Hard water</i>
Apparence de la formule et de ses dilutions <i>Appearance formula dilutions</i>	Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai <i>Preparation physically homogeneous and stable during test</i>
Souches testées <i>Tested strains</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ <b>Pseudomonas aeruginosa</b> CIP 103467 (équivalent ATCC 15442)</li><li>○ <b>Staphylococcus aureus</b> CIP 483 (équivalent ATCC 6538)</li><li>○ <b>Enterococcus hirae</b> CIP 5855 (équivalent ATCC 10541)</li></ul>
Substance interférente <i>Interfering substance</i>	Albumine bovine à 3g/l + 3ml/l érythrocytes <i>3 g/l BSA + 3ml/l erythrocytes</i>
Stabilité du mélange formule et substances interférentes <i>Stability of the mixture (formula and interfering substance)</i>	Absence de précipité pendant l'essai <i>Precipitate absent throughout the test</i>
Température d'incubation <i>Incubation temperature</i>	37°C ± 1°C

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

Nature du neutralisant utilisé <i>Nature of the neutralizer agent used</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Formule : F002</li><li>○ <i>Formula : F002</i></li></ul>
Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement <i>Neutralizer agent added to the counting medium</i>	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
<i>Tested strains</i>	<i>Test suspension</i>	<i>Test suspension / 10</i>	<i>Validation suspension</i>	<i>Validation suspension / 10</i>	<i>B Validation suspension</i>	<i>Experimental conditions control</i>	<i>Neutralizer toxicity control</i>	<i>Dilution neutralization control</i>
	<i>N</i>	<i>N<sub>0</sub></i>	<i>N<sub>v</sub></i>	<i>N<sub>v0</sub></i>	<i>N<sub>vB</sub></i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<b>Pseudomonas aeruginosa CIP 103467</b>	2,6.10 <sup>8</sup>	2,6.10 <sup>7</sup>	7,3.10 <sup>2</sup>	7,3.10 <sup>1</sup>	6,5.10 <sup>4</sup>	7,3.10 <sup>1</sup>	6,5.10 <sup>1</sup>	5,1.10 <sup>1</sup>
<b>Staphylococcus aureus CIP 483 (équivalent ATCC)</b>	4,8.10 <sup>8</sup>	4,8.10 <sup>7</sup>	9,4.10 <sup>2</sup>	9,4.10 <sup>1</sup>	8,5.10 <sup>4</sup>	9,1.10 <sup>1</sup>	8,1.10 <sup>1</sup>	6,4.10 <sup>1</sup>
<b>Enterococcus hirae CIP 5855 (équivalent ATCC)</b>	2,4.10 <sup>8</sup>	2,4.10 <sup>7</sup>	7,1.10 <sup>2</sup>	7,1.10 <sup>1</sup>	6,8.10 <sup>4</sup>	6,5.10 <sup>1</sup>	6,5.10 <sup>1</sup>	7,0.10 <sup>1</sup>

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

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

N<sub>0</sub> est compris entre 1,5 x 10<sup>7</sup> UFC/ml et 5 x 10<sup>7</sup> UFC/ml  
*is comprised between 1.5 x 10<sup>7</sup> CFU/ml and 5 x 10<sup>7</sup> CFU/ml*

N<sub>v</sub> est compris entre 3 x 10<sup>2</sup> UFC/ml et 1.6 x 10<sup>3</sup> UFC/ml  
*is comprised between 3 x 10<sup>2</sup> CFU/ml and 1.6 x 10<sup>3</sup> CFU/ml*

N<sub>v0</sub> est compris entre 3 x 10<sup>1</sup> UFC/ml et 1.6 x 10<sup>2</sup> UFC/ml  
*is comprised between 3 x 10<sup>1</sup> CFU/ml and 1.6 x 10<sup>2</sup> CFU/ml*

N<sub>vB</sub> est compris entre 3 x 10<sup>4</sup> UFC/ml et 1.6 x 10<sup>5</sup> UFC/ml  
*is comprised between 3 x 10<sup>4</sup> CFU/ml and 1.6 x 10<sup>5</sup> CFU/ml*

B est supérieur ou égal à 0,0005 x N<sub>vB</sub>  
*are higher or equal to 0,0005 x N<sub>vB</sub>*

A,C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x N<sub>v0</sub>  
*are higher or equal to 0.5 x N<sub>v0</sub>*

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
<b>Pseudomonas aeruginosa CIP</b>	$>3,3.10^4$	$<1,4.10^2$	$<1,4.10^2$
<b>Staphylococcus aureus CIP 483</b>	$>3,3.10^4$	$5,2.10^3$	$<1,4.10^2$
<b>Enterococcus hirae CIP 5855</b>	$>3,3.10^4$	$2,9.10^2$	$<1,4.10^2$

	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
<b>Pseudomonas aeruginosa CIP</b>	$< 2,9$	$\geq 5,3$	$\geq 5,3$
<b>Staphylococcus aureus CIP 483</b>	$< 3,2$	4,0	$\geq 5,6$
<b>Enterococcus hirae CIP 5855</b>	$< 2,9$	4,9	$\geq 5,3$

## 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

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:

Numéro d'identification: 4573 17 08 13727

<b>Nv</b>	C	1460 2	=	7,3E+02		N <sub>v0</sub> = 7,3E+01	UFC/mL
<b>NvB</b>	C	130000 2	=	6,5E+04			UFC/mL
<b>A</b>	C	145 2	=	7,3E+01			UFC/mL
<b>B</b>	C	129 2	=	6,5E+01			UFC/mL
<b>C</b>	C	101 2	=	5,1E+01			UFC/mL

Souche	Dénombrement : 14 à 330 UFC par boîte			
	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 boîtes considérées..... 563  
 n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution ..... 2  
 n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution ..... 2  
 d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte : ..... 10<sup>6</sup>  
Moyenne pondérée :  $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{563}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^6} = 2,6E+08$  UFC/ml      N<sub>0</sub>=N/10<sup>6</sup> = 2,6E+07

Interprétation :  
 N est compris entre 1,5.10<sup>8</sup> UFC/ml et 5.10<sup>8</sup> UFC/ml      2,6E+08      Oui  
 Nv est compris entre 3.10<sup>2</sup> et 1.6.10<sup>3</sup>      7,3E+02      Oui  
 NvB est compris entre 3.10<sup>4</sup> et 1.6.10<sup>5</sup>      6,5E+04      Oui  
 Nv0 est compris entre 3.10<sup>1</sup> et 1.6.10<sup>2</sup>      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

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

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

	De 14 à 330 UFC par boîte		De 14 à 330 UFC par boîte		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	
<b>Nv :</b> témoin suspension	72	74	72	74	<b>Concentration produit %</b>		<b>0,01</b>		<b>0,1</b>		<b>1</b>	
<b>NvB :</b> témoin suspension B	68	62	68	62	Dénombrement à 20h/24h de 14 à 330 UFC par boîte	0	+	+	2	0	0	0
	68	62	68	62		-1	+	+	0	0	0	0
<b>A :</b> témoin des conditions expérimentales	76	69	76	69	Dénombrement à 40h/48h de 14 à 330 UFC par boîte	0	+	+	2	0	0	0
	76	69	76	69		-1	+	+	0	0	0	0
<b>B :</b> témoin de non-toxicité du neutralisant	62	67	62	67								
	62	67	62	67								
<b>C :</b> essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 1 %	54	47	54	47								
	54	47	54	47								
	Lecture 20 à 24 heures		Lecture 40 à 48 heures		Na = $\frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$		>	3,3E+04	<	1,4E+02	<	1,4E+02
<b>Calculs</b>	Nv = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml)		N <sub>v0</sub> , A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml)		Log N <sub>0</sub> = 7,4		Log Na = 4,5		2,1		2,1	
	NvB = $\frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml)				Calcul de réduction = Log N <sub>0</sub> - 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

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 boîte			
	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		

Numéro d'identification: **4573 17 08 13727**

Nv	C	$\frac{1880}{2}$	=	9,4E+02	N <sub>0</sub> =	9,4E+01	UFC/mL
NvB	C	$\frac{170000}{2}$	=	8,5E+04			UFC/mL
A	C	$\frac{181}{2}$	=	9,1E+01			UFC/mL
B	C	$\frac{161}{2}$	=	8,1E+01			UFC/mL
C	C	$\frac{127}{2}$	=	6,4E+01			UFC/mL

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 96  
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution ..... 0  
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution ..... 2  
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte : ..... 10<sup>7</sup>  
Moyenne pondérée :  $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{96}{(0 + 0,1 \times 2) \times 10^7} = 4,8E+08$  UFC/ml N<sub>0</sub>=N<sup>10</sup>= 4,8E+07

Interprétation :  
N est compris entre 1,5.10<sup>8</sup> UFC/ml et 5.10<sup>8</sup> UFC/ml 4,8E+08 Oui  
Nv est compris entre 3.10<sup>2</sup> et 1,6.10<sup>3</sup> 9,4E+02 Oui  
NvB est compris entre 3.10<sup>4</sup> et 1,6.10<sup>5</sup> 8,5E+04 Oui  
Nv0 est compris entre 3.10<sup>1</sup> et 1,6.10<sup>2</sup> 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

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

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

	De 14 à 330 UFC par boîte		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		
	20h/24h	40h/48h		0,01	0,1	1				
Nv : témoin suspension	96	96	Concentration produit %	0,01	0,1	1				
NvB : témoin suspension B	92	92	Dénombrement à 20h/24h de 14 à 330 UFC par boîte	0	+	+	+	+	6	4
	88	88		-1	+	+	47	56	0	0
A : témoin des conditions expérimentales	82	82	Dénombrement à 40h/48h de 14 à 330 UFC par boîte	0	+	+	+	+	6	4
	94	94		-1	+	+	47	56	0	0
B : témoin de non-toxicité du neutralisant	87	87								
	83	83								
C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 1 %	78	78								
	69	69								
	58	58								
	Lecture 20 à 24 heures	Lecture 40 à 48 heures	Na = $\frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$	>	3,3E+04	5,2E+03	<	1,4E+02		
Calculs	Nv = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml)	N <sub>0</sub> , A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml)	Log N <sub>0</sub> = 7,7	Log Na =	4,5	3,7	2,1			
	NvB = $\frac{c \times 1000}{n}$ (en UFC/ml)		Calcul de réduction = Log N <sub>0</sub> - Log Na = Log R	<	3,2	4,0	>	5,6		

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

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

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 boîte			
	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		

Nv	C			N <sub>0</sub> =	UFC/mL
Nv	C	$\frac{1410}{2}$	=	7,1E+02	7,1E+01
NvB	C	$\frac{136000}{2}$	=	6,8E+04	
A	C	$\frac{130}{2}$	=	6,5E+01	
B	C	$\frac{130}{2}$	=	6,5E+01	
C	C	$\frac{140}{2}$	=	7,0E+01	

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 533  
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution ..... 2  
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution ..... 2  
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte : ..... 10<sup>6</sup>  
Moyenne pondérée:  $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{533}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^6} = 2,4E+08$  UFC/ml N<sub>0</sub>=N<sup>10</sup>= 2,4E+07

Interprétation :  
N est compris entre 1,5.10<sup>8</sup> UFC/ml et 5.10<sup>8</sup> UFC/ml 2,4E+08 Oui  
Nv est compris entre 3.10<sup>2</sup> et 1,6.10<sup>3</sup> 7,1E+02 Oui  
NvB est compris entre 3.10<sup>4</sup> et 1,6.10<sup>5</sup> 6,8E+04 Oui  
Nv0 est compris entre 3.10<sup>1</sup> et 1,6.10<sup>2</sup> 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

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

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

	De 14 à 330 UFC par boîte		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		
Nv : témoin suspension	72	72	Concentration produit %	0,01		0,1		1		
	69	69								
NvB : témoin suspension B	71	71	Dénombrement à 20h/24h de 14 à 330 UFC par boîte	0	+	+	26	32	2	0
	65	65		-1	+	+	5	3	0	0
A : témoin des conditions expérimentales	62	62	Dénombrement à 40h/48h de 14 à 330 UFC par boîte	0	+	+	26	32	2	0
	68	68		-1	+	+	5	3	0	0
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		Na = $\frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$	>	3,3E+04		2,9E+02	<	1,4E+02
Calculs	Nv = $\frac{C \times 10}{n}$ (en UFC/ml)	N <sub>0</sub> , A, B, C = $\frac{C}{n}$ (en UFC/ml)	Log N <sub>0</sub> = 7,4	Log Na =	4,5	2,5	2,1			
	NvB = $\frac{C \times 1000}{n}$ (en UFC/ml)		Calcul de réduction = Log N <sub>0</sub> - Log Na = Log R	<	2,9	4,9	>	5,3		

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

SUITE A DONNER :  
VISA : **Conforme**

# Direction Scientifique

## Liste des signataires du document



Nom\_utilisateur : Chrystèle Pluchart  
Titre : Responsable Laboratoire de Microbiologie  
Date : 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  
=====



Sainghin en Mélantois, le 21 septembre 2017

*Sainghin en Mélantois, on the September 21<sup>st</sup> 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

Version E du 21/09/2017

## 2. Sommaire (Summary)

1. Objet de la demande ( <i>Study Number</i> ) n° 36068	1
2. Sommaire ( <i>Summary</i> )	2
3. Introduction ( <i>Introduction</i> )	3
4. Identification de l'échantillon ( <i>Sample Identification</i> )	3
5. Méthode expérimentale ( <i>Experimental Method</i> )	4
5.1. Conditions expérimentales ( <i>Experimental conditions</i> )	4
5.2. Méthode par dilution neutralisation ( <i>Method by dilution neutralisation</i> )	4
6. Résultats ( <i>Results</i> )	5
6.1. Essais de validation des conditions expérimentales ( <i>Validation tests</i> )	5
6.2. Essais d'activité mycobactéricide ( <i>Evaluation of mycobactericidal activity</i> )	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	<b>FC 913019</b>
<i>Code formula</i>	
Numéro d'identification de l'échantillon	<b>5183 17 08 14348</b>
<i>Identification of the sample</i>	
Numéro de lot	<b>2446FM0410</b>
<i>Batch number</i>	
Fabricant	<b>ECOLAB</b>
<i>Manufacturer</i>	
Date de réception au laboratoire	Le 31/07/17
<i>Receipt date at the laboratory</i>	<i>On the 31/07/17</i>
Conditions de stockage au laboratoire	T° ambiante et obscurité
<i>Storage conditions at the laboratory</i>	<i>Room temperature and darkness</i>
Substances actives	Solution of 20g/l : > 1000 ppm peracetic acid (CAS 79-21-0)
<i>Activ substances</i>	
Période d'essai	Du 30/08/17 au 20/09/17
<i>Period of analysis</i>	<i>From 30/08/17 to 20/09/17</i>

## 5. Méthode expérimentale (Experimental Method)

### 5.1. Conditions expérimentales (Experimental conditions)

Température de l'essai	20°C ± 1°C
<i>Test temperature</i>	
Temps de contact	10 minutes ± 10s
<i>Contact Time</i>	
Diluant de la formule lors des essais	Eau dure
<i>Diluent of the formula used during the test</i>	<i>Hard water</i>
Diluant de la formule lors des essais	Préparation physiquement homogène et stable pendant l'essai
<i>Appearance formula dilutions</i>	<i>Preparation physically homogeneous and stable during test</i>
Souches testées	<ul style="list-style-type: none"><li>○ <b>Mycobacterium avium DSM 44157 (equivalent ATCC 15769)</b></li><li>○ <b>Mycobacterium terrae CIP 104321 (equivalent ATCC 15755)</b></li></ul>
<i>Tested strains</i>	
Substance interférente	Albumine bovine à 3g/l + 3ml/l érythrocytes
<i>Interfering substance</i>	<i>3 g/l BSA + 3ml/l erythrocytes</i>
Stabilité du mélange formule et substances interférentes	Absence de précipité pendant l'essai
<i>Stability of the mixture (formula and interfering substance)</i>	<i>Precipitate absent throughout the test</i>
Température d'incubation	37°C ± 1°C
<i>Incubation temperature</i>	<i>37°C ± 1°C</i>

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

Nature du neutralisant utilisé	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Formule : F002</li></ul>
<i>Nature of the neutralizer agent used</i>	<i>○ Formula : F002</i>
Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement	10%
<i>Neutralizer agent added to the counting medium</i>	<i>10%</i>

## 6. Résultats (Results)

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

Vérification de la méthodologie et validation de la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de 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
<i>Tested strains</i>	<i>Test suspension</i>	<i>Test suspension / 10</i>	<i>Validation suspension</i>	<i>Validation suspension / 10</i>	<i>Experimental conditions control</i>	<i>Neutralizer toxicity control</i>	<i>Dilution neutralization control</i>
	<i>N</i>	<i>N<sub>0</sub></i>	<i>N<sub>v</sub></i>	<i>N<sub>v0</sub></i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<b>Mycobacterium avium</b>	2,7.10 <sup>9</sup>	2,7.10 <sup>8</sup>	6,9.10 <sup>2</sup>	6,9.10 <sup>1</sup>	7,5.10 <sup>1</sup>	6,9.10 <sup>1</sup>	7,5.10 <sup>1</sup>
<b>Mycobacterium terrae</b>	2,1.10 <sup>9</sup>	2,1.10 <sup>8</sup>	6,7.10 <sup>2</sup>	6,7.10 <sup>1</sup>	6,5.10 <sup>1</sup>	6,5.10 <sup>1</sup>	7,1.10 <sup>1</sup>

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<sub>0</sub>* 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<sub>v</sub>* 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<sub>v0</sub>* 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  $0,5 \times N_{v0}$   
*is higher or equal to  $0.5 \times N_{v0}$*

La neutralisation est validée avec la méthode par dilution neutralisation pour la concentration d'essai de 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
<b>Mycobacterium avium</b>	7,6.10 <sup>4</sup>	1,1.10 <sup>3</sup>	<1,4.10 <sup>2</sup>
<b>Mycobacterium terrae</b>	1,0.10 <sup>6</sup>	<1,4.10 <sup>2</sup>	<1,4.10 <sup>2</sup>

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
<b>Mycobacterium avium</b>	3,5	<u>5,4</u>	<u>&gt; 6,3</u>
<b>Mycobacterium terrae</b>	2,3	<u>&gt; 6,2</u>	<u>&gt; 6,2</u>

## 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 (June 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

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**

Numéro d'identification: **5183 17 08 14348**

**Dénombrement de la suspension bactérienne :**

Souche	Dénombrement : 14 à 330 UFC par boîte							
	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				

N <sub>V</sub>	C		=		N <sub>0</sub> =	UFC/mL
		1380		6,9E+02	6,9E+01	
A		149		7,5E+01		UFC/mL
B		137		6,9E+01		UFC/mL
C		150		7,5E+01		UFC/mL

C : somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées..... 596 ..... N est compris entre 1,5.10<sup>8</sup> UFC/ml et 5.10<sup>8</sup> UFC/ml 2,7E+09 Oui  
n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution ..... 2 ..... N<sub>0</sub> est compris entre 3.10<sup>2</sup> et 1.6.10<sup>3</sup> 6,9E+02 Oui  
n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution ..... 2 ..... N<sub>0</sub> est compris entre 3.10<sup>1</sup> et 1.6.10<sup>2</sup> 6,9E+01 Oui  
d : facteur de dilution correspondant à la première dilution : ..... 10<sup>7</sup> ..... A.B.C est supérieur ou égal à 0.5 x N<sub>0</sub> Oui

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

**Interprétation :**

La neutralisation est validée : Oui

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

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

N <sub>V</sub> :	De 14 à 330 UFC par boîte		De 14 à 330 UFC par boîte		Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml		0,625		1,25		2,5										
	38	40	38	40			0,5		1		2										
témoin suspension	33	27	33	27	Concentration produit %		0,5		1		2										
A : témoin des conditions expérimentales	30	45	30	45	Lecture intermédiaire à 14 jours de 14 à 330 UFC par boîte	0	+	+	62	51	4	2									
	38	36	38	36		-1	+	+	44	56	3	5									
						-2	40	36	1	0	0	0									
						-3	38	37	0	0	0	0									
B : témoin de non-toxicité du neutralisant	41	27	41	27	Dénombrement à 21 jours de 14 à 330 UFC par boîte	0	+	+	62	51	4	2									
	30	39	30	39		-1	+	+	6	0	0	0									
						-2	40	36	1	0	0	0									
						-3	38	37	0	0	0	0									
C : essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 2 %	37	32	37	32	0	+	+	44	56	3	5										
	39	42	39	42	-1	+	+	6	0	0	0										
					-2	40	36	1	0	0	0										
					-3	38	37	0	0	0	0										
Lecture intermédiaire à 14 jours				Lecture à 21 jours				Na = $\frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$		7,6E+04		1,1E+03		<		1,4E+02					
Calculs				N <sub>v</sub> = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml)				N <sub>0</sub> , A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml)				Log N <sub>0</sub> = <b>8,4</b>		Log Na = <b>4,9</b>		<b>3,0</b>		<b>2,1</b>			
N <sub>w</sub> = $\frac{c \times 10}{(n1 + 0,1n2) \times 10^{-5}}$ (en UFC/ml)				C : somme des valeurs Vc prises en compte				n : nombre de boîtes considérées				Calcul de réduction = Log N <sub>0</sub> - Log Na = Log R		<b>3,5</b>		<b>5,4</b>		<b>&gt;</b>		<b>6,3</b>	

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

Page 3/4

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

Page 4/4

# 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

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

Numéro d'identification: 5183 17 08 14348

**Dénombrement de la suspension bactérienne :**

Souche	Dénombrement : 14 à 330 UFC par boîte							
	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 <sub>v</sub>	C	$\frac{1330}{2}$	=	6,7E+02	N <sub>v0</sub> =	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 boîtes considérées..... 468  
 n1 : nombre de boîtes prises en compte à la première dilution ..... 2  
 n2 : nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution ..... 2  
 d : facteur de dilution correspondant à la première dilution : ..... 10<sup>7</sup>

**Interprétation :**

N est compris entre 1,5.10<sup>9</sup> UFC/ml et 5.10<sup>9</sup> UFC/ml ..... 2,1E+09 ..... Oui  
 N<sub>v</sub> est compris entre 3.10<sup>2</sup> et 1.6.10<sup>3</sup> ..... 6,7E+02 ..... Oui  
 N<sub>v0</sub> est compris entre 3.10<sup>1</sup> et 1.6.10<sup>2</sup> ..... 6,7E+01 ..... Oui  
 A R C est supérieur ou égal à 0,5 x N<sub>v0</sub> ..... Oui

Moyenne pondérée :  $\frac{C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} = \frac{468}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^7} = 2,1E+09$  UFC/ml  
 N<sub>0</sub> = N/10 = 2,1E+08 UFC/ml

La neutralisation est validée : Oui

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

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

N <sub>v</sub>	témoin suspension	De 14 à 330 UFC par boîte		De 14 à 330 UFC par boîte		Volume pipeté de produit pour fiole de 100 ml		0,625		1,25		2,5		
		27	35	27	35	0	0,625	1,25	2,5	0	0,625	1,25	2,5	
A	témoin des conditions expérimentales	32	33	32	33	Concentration produit %		0,5		1		2		
B	témoin de non-toxicité du neutralisant	30	35	30	35	Lecture intermédiaire à 14 jours de 14 à 330 UFC par boîte	0	+	+	0	0	0	0	0
		30	35	30	35		-1	+	+	0	0	0	0	0
		30	35	30	35		-2	+	+	0	0	0	0	0
		30	35	30	35		-3	54 62	51 39	0	0	0	0	0
C	essai de l'inactivation par dilution neutralisation à 2 %	30	39	30	39	Dénombrement à 21 jours de 14 à 330 UFC par boîte	0	+	+	0	0	0	0	0
		30	39	30	39		-1	+	+	0	0	0	0	0
		30	39	30	39		-2	+	+	0	0	0	0	0
		30	39	30	39		-3	54 62	51 39	0	0	0	0	0
Lecture intermédiaire à 14 jours		Lecture à 21 jours		Na = $\frac{C \times 10}{n} \times \text{dilution}$		1,0E+06	<	1,4E+02	<	1,4E+02				
Calculs		N <sub>v</sub> = $\frac{c \times 10}{n}$ (en UFC/ml)	N <sub>v0</sub> , A, B, C = $\frac{c}{n}$ (en UFC/ml)	Log N <sub>0</sub> = 8,3		Log Na = 6,0		2,1		2,1				
		N <sub>w</sub> = $\frac{c \times 10}{(n1 + 0,1n2) \times 10^5}$ (en UFC/ml)		Calcul de réduction = Log N <sub>0</sub> - Log Na = Log R		2,3		>		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

Page 3/4

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

Page 4/4

# 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

---