DOSSIER SCIENTIFIQUE
SCIENTIFIC FILE

PHAGO'SCOPE APA

Désinfectant de haut niveau à base d'Acide peracétique pour l'instrumentation médicale, chirurgicale, thermosensible et matériel d'endoscopie

High-level peracetic acid-based disinfectant for medical, surgical, thermosensitive instrumentation and endoscopy equipment

CE
0459

CHRISTEYNS
MEDICAL CARE

Christeyns France
31 rue de la Maladrie
44120 Vertou - France
Tel : +33 (0)2 40 80 27 27 / Fax : +33 (0)2 40 03 09 73
www.christeyns.com

CHRISTEYNS

ATTESTATION D'EQUIVALENCE

Je soussignée, Julie Demontreuille, agissant en qualité de toxicologue au sein du comité d'expertise scientifique de Christeyns France, atteste que les produits suivants :

1264,
F178
Et
PHAGO'SCOPE APA

1265,
F179
Et
PHAGO'SCOPE Neutralisant

Ont respectivement une formule strictement identique.

Cette attestation est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Vertou, le 13/03/2019

Julie Demontreuille

Christeyns France S.A. 31 rue de la Maladrie BP 2421 44 124 VERTOU Cedex
T +33 2 40 80 27 27 **E** info@christeyns.com **E** www.christeyns.com
RCS NANTES B 321 302 689 00013 | APE 2041Z

RAPPORT D'ESSAI N°3600-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Imprimé le : 27/04/15
Date de 1ère impression : 27/04/15

Test d'efficacité bactéricide
selon la norme NF EN 1040 (Avril 2006)
1264 + 1265 neutralisant (pH4)
(Méthode par filtration sur membrane)

DESTINATAIRE : CHRISTEYNS FRANCE

I- IDENTIFICATION DU DONNEUR D'ORDRE

Mr. Jérôme DUBOURGEOIS
CHRISTEYNS FRANCE
31 rue de la Maladrie
44120 VERTOU
Tél. 02-40-80-27-27 - Fax. 02-40-03-09-73

II- IDENTIFICATION DE L'ECHANTILLON

- Nom du produit : **1264+1265 neutralisant (pH4)**
- Numéro de lot : PR1264, lot PR171-23 et 1265 neutralisant, lot PR171-N11
- Fabricant : CHRISTEYNS France
- Date de fabrication : 27/03/15 pour les 2 produits
- Date de péremption : 27/09/16 pour les 2 produits
- Fabricant : CHRISTEYNS FRANCE
- Date de réception au laboratoire : 02/04/15
- Aspect du produit : mélange liquide limpide incolore
- Conditions de stockage : à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Diluant du produit recommandé par le fabricant : non concerné
- Matière(s) active(s) : Non communiquées

RAPPORT D'ESSAI N°3600-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

III- METHODE D'ESSAI

Norme NF EN 1040 (Avril 2006) : Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de base des antiseptiques et des désinfectants chimiques.
Phase 1, étape 1.
Réduction logarithmique au moins égale à 5 log décimaux dans les conditions de l'essai.

Liquide de rinçage : eau distillée (stérilisation 121°C-20 minutes).

IV- CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Période d'analyse : du 23/04/15 au 27/04/15
- Analyse réalisée par : M.TEULIER
- Diluant du produit utilisé au cours de l'essai : eau distillée
- Concentrations de produit testé (V/V) : 20 – 40 – 80 %
- Technique d'essai : filtration sur membrane
- Aspect des dilutions : limpides
- Stabilité et aspect du mélange: absence de précipité au cours de l'essai
- Temps de contact : 5 minutes (+/-10 secondes)
- Température d'essai : 20°C (+/-1°C)
- Température d'incubation : 37°C (+/-1°C)
- Identification des souches utilisées :
    - *Staphylococcus aureus* DSM 799
    - *Pseudomonas aeruginosa* DSM 939

RAPPORT D'ESSAI N°3600-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

V- RESULTATS D'ESSAI

Vc : nombre de colonies comptées sur les boîtes,
N: nombre d'UFC / ml dans la suspension microbienne d'essai,
N_0: nombre de cellules par ml dans le mélange d'essai au début du temps de contact, il représente un dixième de N,
Nv : Nombre de cellules par ml de la suspension microbienne de validation. Il est 10 fois supérieur aux dénombrements en termes de valeurs de Vc en raison de l'étape de dilution à 10^{-1},
Nv_0 : Nombre de cellules par ml dans les mélanges A, B et C au début du temps de contact. Il représente un dixième de Nv,
Na : Nombre de survivants par ml dans le mélange d'essai à l'issue du temps de contact et avant neutralisation ou filtration sur membrane,
A : nombre de survivants dans le témoin des conditions expérimentales,
B : nombre de survivants dans le témoin du neutralisant ou du témoin de filtration,
C : nombre de survivants dans le témoin de validation de la méthode,
R : réduction du nombre de cellules viables ($R=N_0/Na$ ou $LogR=LogN_0-LogNa$).

RAPPORT D'ESSAI N°3600-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Essai sur *Staphylococcus aureus DSM 799*

Souche testée	Suspension microbienne d'essai	Essai de validation			
		Suspension microbienne	Conditions expérimentales (A)	Témoin du neutralisant ou du témoin de filtration (B)	Inactivation par neutralisation ou par filtration sur membrane (C)
Staphylococcus aureus DSM 799 Lot 567	10^{-6} : Vc1 : 290 Vc2 : 328 10^{-7} : Vc1 : 38 Vc2 : 34 N= $3,14.10^8$ N_0= $3,14.10^7$ Log N_0 = 7,50	Vc1 : 72 Vc2 : 69 Nv= 705 Nv_0= 71	Vc1 : 69 Vc2 : 62 A= 66	Vc1 : 74 Vc2 : 63 B= 69	Vc1 : 62 Vc2 : 78 C= 70

L'essai est validé si :
N est compris entre $1,5.10^8$ et 5.10^8 UFC/ml (8,17 ≤lg ≤8,70)
N_0 est compris entre $1,5.10^7$ et 5.10^7 UFC/ml (7,17 ≤lg ≤7,70)
N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml (N_v est compris entre 300 et 1600 UFC/ml)
A, B, C est supérieur ou égal à 0,5xN_{v0}
Le quotient des dénombrements obtenus par moyenne pondérée est compris entre 5 et 15

Souche testée	Concentrations testées % (V/V)					
		20 %	40%	80%		
Staphylococcus aureus DSM 799 Lot 567	Vc	0 ; 0	0 ; 0	0 ; 0		
	Na Log N_a	< 140 < 2,15	< 140 < 2,15	< 140 < 2,15		
	R	> 5,35	> 5,35	> 5,35		

RAPPORT D'ESSAI N°3600-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Essai sur *Pseudomonas aeruginosa* DSM 939

Souche testée	Suspension microbienne d'essai	Essai de validation			
		Suspension microbienne	Conditions expérimentales (A)	Témoin du neutralisant ou du témoin de filtration (B)	Inactivation par neutralisation ou par filtration sur membrane (C)
Pseudomonas aeruginosa DSM 939 Lot 556	10^{-6} : Vc1 : 163 Vc2 : 172 10^{-7} : Vc1 : 15 Vc2 : 17 N= $1,67.10^8$ N_0= $1,67.10^7$ Log N_0 = 7,22	Vc1 : 44 Vc2 : 54 Nv= 490 Nv_0= 49	Vc1 : 58 Vc2 : 63 A= 61	Vc1 : 69 Vc2 : 69 B= 69	Vc1 : 64 Vc2 : 72 C= 68

L'essai est validé si :
N est compris entre $1,5.10^8$ et 5.10^8 UFC/ml (8,17 ≤lg ≤8,70)
N_0 est compris entre $1,5.10^7$ et 5.10^7 UFC/ml (7,17 ≤lg ≤7,70)
N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml (N_v est compris entre 300 et 1600 UFC/ml)
A, B, C est supérieur ou égal à 0,5xN_{v0}
Le quotient des dénombrements obtenus par moyenne pondérée est compris entre 5 et 15

Souche testée		Concentrations testées % (V/V)				
		20 %	40%	80%		
Pseudomonas aeruginosa DSM 939 Lot 556	Vc	0 ; 0	0 ; 0	0 ; 0		
	Na Log N_a	< 140 < 2,15	< 140 < 2,15	< 140 < 2,15		
	R	> 5,07	> 5,07	> 5,07		

RAPPORT D'ESSAI N°3600-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

VI- CONCLUSION

Selon la méthodologie de la norme NF EN 1040 (Avril 2006), le mélange 1264+1265 neutralisant (pH 4 ; lots PR171-23 et PR171-N11) de la société CHRISTEYNS France, dans les conditions d'essai suivantes :
- en 5 minutes de temps de contact,
- à la température de 20°C,

présente une activité bactéricide (réduction supérieure à 5 log décimaux), lorsqu'il est dilué à 20%, 40% et 80% (V/V), vis-à-vis des souches *Staphylococcus aureus* DSM 799 et *Pseudomonas aeruginosa DSM 939.*

Dans ces conditions d'essais, les concentrations efficaces du lot PR171-F23 + PR171-N11 du produit 1264+1265 neutralisant (pH4) sont au final de 20%, 40% et 80% (V/V).

Les souches sont conservées et contrôlées selon la norme NF EN 12353.
Les souches d'essai ont été soumises à essai une seule fois.

Commentaires :
Avant l'essai la solution 1264 a été neutralisée par la solution 1265 neutralisant selon le protocole suivant :
496,8g de 1264 + 24,5g de 1265 neutralisant (sous agitation), le pH obtenu est de 4,18.

VII-SIGNATURES

Fait à DINARD, le 29/04/15

Rédigé par	Validé par
M.TEULIER Responsable d'essai	**M.SESQUES** Docteur en microbiologie Directeur technique

RAPPORT D'ESSAI N°3601-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Imprimé le : 03/07/15
Date de 1ère impression : 03/07/15

TEST D'EFFICACITE BACTERICIDE
SELON LA NORME NF EN 13727+A1 (Décembre 2013)
1264+1265 neutralisant (pH4)
Application = Désinfection de dispositifs médicaux
Souches obligatoires et souche additionnelle de *Campylobacter jejunii* DSM 4688
(Méthode par dilution/neutralisation)

DESTINATAIRE : CHRISTEYNS FRANCE

I- IDENTIFICATION DU DONNEUR D'ORDRE

Mr. Jérôme DUBOURGEOIS
CHRISTEYNS FRANCE
31 rue de la Maladrie
44120 VERTOU
Tél. 02-40-80-27-27 - Fax. 02-40-03-09-73

II- IDENTIFICATION DE L'ECHANTILLON

- Nom du produit : **1264+1265 neutralisant (pH4)**
- Numéro de lot : PR171-F23 + PR171-N11
- Fabricant : CHRISTEYNS FRANCE
- Date de fabrication : 27/03/15
- Date de péremption : 27/09/16
- Date de réception au laboratoire : 02/04/15
- Aspect du mélange : liquide limpide incolore
- Conditions de stockage : à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Diluant du produit recommandé par le fabricant : non concerné
- Matière(s) active(s) : Non communiquées

RAPPORT D'ESSAI N°3601-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

III- METHODE D'ESSAI

Norme NF EN 13727+A1 (Décembre 2013) : Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide en médecine. (Phase 2, Etape 1)

Application « Désinfection de dispositifs médicaux» : Réduction logarithmique au moins égale à 5 Log décimaux dans les conditions de l'essai.

IV- CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Période d'analyse : du 11/06/15 au 29/06/15
- Analyse réalisée par : AF. GABILLET et M . TEULIER
- Diluant du produit utilisé au cours de l'essai : eau distillée
- Concentrations de produit testé (V/V) : 20%-40% et 80%
- Technique d'essai : dilution/neutralisation
- Aspect des dilutions : limpides
- Stabilité du mélange substance interférente/dilutions du produit/suspension microbienne : absence de précipité au cours de l'essai
- Temps de contact : 5 minutes (+/-10 secondes)
- Température d'essai : 20°C (+/-1°C)
- Substance interférente : 0,3 g/l d'albumine bovine (conditions de propreté)
- Température d'incubation : 37°C (+/-1°C)
- Identification des souches utilisées :
  Enterococcus hirae DSM 3320
  Staphylococcus aureus DSM 799
  Pseudomonas aeruginosa DSM 939
  Campylobacter jejunii DSM 4688

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

- Neutralisants (stérilisés à 121°C pendant 20 minutes):
    - 3% Polysorbate 80 (m/V), 0,3% Lécithine d'œuf (m/V), 15% Thiosulfate de sodium (m/V) pour *Enterococcus hirae* DSM 3320, *Staphylococcus aureus* DSM 799 et *Pseudomonas aeruginosa* DSM 939.
    - 6% Polysorbate 80 (m/V), 0,6% Lécithine d'œuf (m/V), 1% Thiosulfate de sodium (m/V) ; 0,5% Glycine (m/V) ; 0,2% peptone de caséine (m/V) ; 1,8% Phosphate disodique (m/V) ; 0,3% Phosphate monopotassique (m/V) ; 1,7% Chlorure de sodium (m/V) pour *Campylobacter jejunii* DSM 4688.

V- RESULTATS D'ESSAI

Vc : nombre de colonies comptées sur les boîtes,
N: nombre d'UFC / ml dans la suspension microbienne d'essai,
N_0: nombre de cellules par ml dans le mélange d'essai au début du temps de contact, il représente un dixième de N,
Nv : nombre de cellules par ml de la suspension microbienne de validation,
Nv_0 : nombre de cellules par ml dans les mélanges A, B et C au début du temps de contact. Il représente un dixième de Nv,
Nv_B : dans le cas du témoin de neutralisant B, il s'agit du nombre de cellules par ml après dilution au centième. Il représente un millième de Nv,
Na : nombre de survivants par ml dans le mélange d'essai à l'issue du temps de contact et avant neutralisation
A : nombre de survivants dans le témoin des conditions expérimentales,
B : nombre de survivants dans le témoin de neutralisant,
C : nombre de survivants dans le témoin de validation de la méthode,
R : réduction du nombre de cellules viables ($R=N_0/Na$) exprimé en logarithme

RAPPORT D'ESSAI N°3601-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Essai sur *Enterococcus hirae* DSM 3320

Souche testée	Suspension bactérienne d'essai	Essai de validation				
		Suspension bactérienne (NV)	Suspension bactérienne (NVB)	Conditions expérimentales (A)	Non toxicité du neutralisant (B)	Inactivation par dilution/neutralisation (C)
Enterococcus hirae DSM 3320 Lot 568	10^{-6} : Vc1 : 268 Vc2 : 252 10^{-7} : Vc1 : 25 Vc2 : 37 N= 2,65.10^8 N_0= 2,65.10^7 Log N_0 = 7,42	Vc1 : 72 Vc2 : 80 (dilution 10^{-1}) Nv= 760 Nv_0= 76	Vc1 : 69 Vc2 : 71 (dilution 10^{-3}) Nv_B= 7,0.10^4	Vc1 : 99 Vc2 : 99 A= 99	Vc1 : 97 Vc2 : 78 B= 88	Pour 80% Vc1 : 85 Vc2 : 90 C(80%) = 88

L'essai est validé si :
N est compris entre 1,5.10^8 et 5.10^8 UFC/ml (8,17 ≤ lg N ≤ 8,70)
N_0 est compris entre 1,5.10^7 et 5.10^7 UFC/ml (7,17 ≤ lg N ≤ 7,70)
N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml (N_v est compris entre 300 et 1600 UFC/ml)
Nv_B est compris entre 3,0.10^4 et 1,6.10^5
A,B et C sont supérieurs ou égaux à 0,5xN_{v0}
B (dilution-neutralisation) est égal ou supérieur à 0,0005 x Nv_B
Le quotient des dénombrements obtenus par moyenne pondérée est compris entre 5 et 15

Souche testée	Concentrations testées % (V/V)											
		20%		40%		80%						
Enterococcus hirae DSM 3320 Lot 568		10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}
	Vc1 Vc2	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0				
	Na	<140		<140		<140					
	lg Na	<2,15		<2,15		<2,15					
	Lg R	>5,27		>5,27		>5,27					

RAPPORT D'ESSAI N°3601-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Essai sur *Staphylococcus aureus* DSM 799

Souche testée	Suspension bactérienne d'essai	Essai de validation				
		Suspension bactérienne (NV)	Suspension bactérienne (NVB)	Conditions expérimentales (A)	Non toxicité du neutralisant (B)	Inactivation par dilution/neutralisation (C)
Staphylococcus aureus DSM 799 567	10^{-6} : Vc1 : 208 Vc2 : 224 10^{-7} : Vc1 : 32 Vc2 : 37 N= 2,28.10^8 N_0= 2,28.10^7 Log N_0 =7,36	Vc1 : 48 Vc2 : 67 (dilution 10^{-1}) Nv= 575 Nv_0= 58	Vc1 : 61 Vc2 : 62 (dilution 10^{-3}) Nv_B=6,15.10^4	Vc1 : 63 Vc2 : 69 A= 66	Vc1 : 75 Vc2 : 84 B= 80	Pour 80% Vc1 : 72 Vc2 : 73 C(80%)= 73

L'essai est validé si :
N est compris entre 1,5.10^8 et 5.10^8 UFC/ml (8,17 ≤ lg N ≤ 8,70)
N_0 est compris entre 1,5.10^7 et 5.10^7 UFC/ml (7,17 ≤ lg N ≤ 7,70)
N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml (N_v est compris entre 300 et 1600 UFC/ml)
Nv_B est compris entre 3,0.10^4 et 1,6.10^5
A,B et C sont supérieurs ou égaux à 0,5xN_{v0}
B (dilution-neutralisation) est égal ou supérieur à 0,0005 x Nv_B
Le quotient des dénombrements obtenus par moyenne pondérée est compris entre 5 et 15

Souche testée	Concentrations testées % (V/V)											
		20%		40%		80%						
Staphylococcus aureus DSM 799 Lot 567		10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}
	Vc1 Vc2	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0				
	Na	<140		<140		<140					
	lg Na	<2,15		<2,15		<2,15					
	Lg R	>5,21		>5,21		>5,21					

RAPPORT D'ESSAI N°3601-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Essai sur *Pseudomonas aeruginosa* DSM 939

Souche testée	Suspension bactérienne d'essai	Essai de validation				
		Suspension bactérienne (NV)	Suspension bactérienne (NVB)	Conditions expérimentales (A)	Non toxicité du neutralisant (B)	Inactivation par dilution/neutralisation (C)
Pseudomonas aeruginosa DSM 939 Lot 556	10^{-6} : Vc1 : 181 Vc2 : 192 10^{-7} : Vc1 : 23 Vc2 : 22 N= 1,90.10^8 N_0= 1,90.10^7 Log N_0 = 7,28	Vc1 : 54 Vc2 : 42 (dilution 10^{-1}) Nv= 480 Nv_0= 48	Vc1 : 42 Vc2 : 48 (dilution 10^{-3}) Nv_B= 4,50.10^4	Vc1 :66 Vc2 : 64 A= 65	Vc1 : 80 Vc2 : 68 B= 74	Pour 40% Vc1 : 29 Vc2 : 38 Pour 80% Vc1 : 9 Vc2 : 9 C(40%)= 34 C(80%) = 9

L'essai est validé si :
N est compris entre 1,5.10^8 et 5.10^8 UFC/ml (8,17 ≤ lg N ≤ 8,70)
N_0 est compris entre 1,5.10^7 et 5.10^7 UFC/ml (7,17 ≤ lg N ≤ 7,70)
N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml (N_v est compris entre 300 et 1600 UFC/ml)
Nv_B est compris entre 3,0.10^4 et 1,6.10^5
A,B et C sont supérieurs ou égaux à 0,5xN_{v0}
B (dilution-neutralisation) est égal ou supérieur à 0,0005 x Nv_B
Le quotient des dénombrements obtenus par moyenne pondérée est compris entre 5 et 15

Souche testée	Concentrations testées % (V/V)										
		20%		40%		80%					
		10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}
Pseudomonas aeruginosa DSM 939 Lot 556	Vc1 Vc2	0 0	0 0	0 0	0 0	Concentration non interprétable car test C non validé pour 80%					
	Na	<140		<140							
	lg Na	<2,15		<2,15							
	Lg R	>5,13		>5,13							

RAPPORT D'ESSAI N°3601-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Imprimé le : 03/07/15
Date de 1ère impression : 03/07/15

Essai sur *Campylobacter jejunii* DSM 4688

Souche testée	Suspension bactérienne d'essai	Essai de validation				
		Suspension bactérienne (NV)	Suspension bactérienne (NVB)	Conditions expérimentales (A)	Non toxicité du neutralisant (B)	Inactivation par dilution/neutralisation (C)
Campylobacter jejunii DSM 4688 Lot 314	10^{-6} : Vc1 : 163 Vc2 : 170 10^{-7} : Vc1 : 19 Vc2 : 21 N= 1,70.10^8 N_0= 1,70.10^7 Log N_0 = 7,23	Vc1 :31 Vc2 : 29 (dilution 10^{-1}) Nv= 300 Nv_0=30	Vc1 : 32 Vc2 : 41 (dilution 10^{-3}) Nv_B= 3,65.10^4	Vc1 : 24 Vc2 : 30 A= 27	Vc1 : 37 Vc2 : 31 B= 34	Pour 20% Vc : 21 ;24 Pour 40% Vc : 0 ;0 Pour 80% Vc : 0 ;0 C(20%)= 23 C(40%)= 0 C(80%) = 0

L'essai est validé si :
N est compris entre 1,5.10^8 et 5.10^8 UFC/ml (8,17 ≤ lg N ≤ 8,70)
N_0 est compris entre 1,5.10^7 et 5.10^7 UFC/ml (7,17 ≤ lg N ≤ 7,70)
N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml (N_v est compris entre 300 et 1600 UFC/ml)
Nv_B est compris entre 3,0.10^4 et 1,6.10^5
A,B et C sont supérieurs ou égaux à 0,5xN_{v0}
B (dilution-neutralisation) est égal ou supérieur à 0,0005 x Nv_B
Le quotient des dénombrements obtenus par moyenne pondérée est compris entre 5 et 15

Souche testée	Concentrations testées % (V/V)											
		20%		40%		80%						
Campylobacter jejunii DSM 4688 Lot 314		10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}	10^0	10^{-1}	
	Vc1 Vc2	0 0	0 0	Concentrations non interprétables car test C non validé pour 40% et 80%								
	Na	<140										
	lg Na	<2,15										
	Lg R	>5,08										

RAPPORT D'ESSAI N°3601-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

VI- CONCLUSION

Selon la méthodologie de la norme NF EN 13727 + A1 (Décembre 2013), le lot PR171-F23 + PR171-N11 du produit 1264+1265 neutralisant (pH4) de la société CHRISTEYNS FRANCE, dans les conditions d'essai suivantes :

- en 5 minutes de temps de contact,
- à la température de 20°C,
- en présence d'albumine bovine à 0,3 g/l (conditions de propreté),

présente une activité bactéricide (réduction supérieure ou égale à 5 log décimaux dans le cas de l'application « Désinfection de dispositifs médicaux »), lorsqu'il est dilué :

- à 20%, 40% et 80% (V/V) vis-à-vis des souches *Enterococcus hirae* DSM 3320 et Staphylococcus aureus DSM 799,
- à 20% et 40% (V/V) vis-à-vis de la souche *Pseudomonas aeruginosa* DSM 939,
- à 20% (V/V) vis-à-vis de la souche *Campylobacter jejunii* DSM 4688*.

Les souches sont conservées et contrôlées selon la norme NF EN 12353.
Les souches d'essai ont été soumises à essai une seule fois.

Commentaires :
Avant l'essai la solution 1264 a été neutralisée par la solution 1265 neutralisant selon le protocole suivant :
496,8g de 1264 + 24,5g de 1265 neutralisant (sous agitation)
pour l'essai sur *Staphylococcus aureus* DSM 799 *Enterococcus hirae* DSM 3320 *et Pseudomonas aeruginosa* DSM 939 , le pH obtenu est de 4,18,
pour l'essai sur *Campylobacter jejunii DSM 4688*, le pH obtenu est de 4,05.

La concentration de 80% n'est pas interprétable pour la souche *Pseudomonas aeruginosa* DSM 939 car le test C (validation de l'inactivation par dilution/neutralisation) n'est pas validé pour cette concentration mais le test C est validé pour la concentration active de 40%.

RAPPORT D'ESSAI N°3601-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Les concentrations de 40% et 80% ne sont pas interprétables pour la souche *Campylobacter jejunii* DSM 4688 car les test C (validation de l'inactivation par dilution/neutralisation) ne sont pas validés pour ces concentrations mais le test C est validé pour la concentration active de 20%.

*La souche *Campylobacter jejunii* DSM 4688 a été cultivée sur de la gélose COLUMBIA additionnée de 4% de sang de mouton défibriné en atmosphère de microaérophilie pendant une durée de 2 à 5 jours.

VII-SIGNATURES

Fait à DINARD,

Rédigé par	Validé par
AF. GABILLET Responsable d'essai	M.SESQUES Docteur en microbiologie Directeur technique p/o P. FOUTEL Responsable Qualité

LMH
CMI – 18 rue Franklin Roosevelt
B.P. 80 139 - 35 401 Saint Malo cedex

Saint Malo le 6 décembre 2016

Monsieur Dubourgeois

Vous nous avez interrogés sur les modifications apportées à la norme NF EN 13727 + A1 datant de décembre 2013 et sa nouvelle version NF EN 13727 + A2 sortie en décembre 2015. En résumé, ces modifications sont dans l'ensemble essentiellement éditoriales et ne concerne sur le plan technique qu'une disposition mineure sur les produits destinés au lavage hygiénique des mains.

Il est précisé dans l'avant-propos de la norme que « les données obtenues avec la version précédente de l'EN 13727 peuvent être encore utilisées si un temps de neutralisation de 10 secondes s'est démontré suffisant pour tous les produits pour lesquels les temps de contact sont égaux ou inférieurs à 10 mn ».

Un test d'efficacité a été mené en juillet 2015 sur le produit dénommé " 1264+1265 neutralisant (ph 4) " en 5 minutes à 20°C en conditions de propreté selon la version NF EN 13727+A1 (décembre 2013) avant la sortie de la nouvelle version. L'application de ce produit concerne la désinfection de dispositifs médicaux. Cette application n'est pas touchée par les modifications de la version de décembre 2015 qui ne s'applique qu'aux produits de lavage hygiénique des mains.

Quant à l'étape de neutralisation modifiée dans la version de 2013 et conservée en l'état dans la version 2015, je vous confirme qu'elle a bien été réalisée avec un temps de neutralisation de 10 secondes. Cette étape a bien été validée lors de cet essai.

Donc en fonction de tous ces éléments, je vous confirme qu'il n'est pas nécessaire pour vous de tester de nouveau ce produit selon la nouvelle version et que les résultats obtenus sont parfaitement valables en regard de la version NF EN 13 727 + A2 de décembre 2015.

En espérant avoir répondu à votre interrogation. Je vous prie de croire monsieur Dubourgeois en l'expression de nos salutations les plus respectueuses.

Martine SESQUES
Docteur en microbiologie
Directeur opérationnel et technique

RAPPORT D'ESSAI N°3602-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Imprimé le : 29/06/15
Date de 1ère impression : 29/06/15

Test d'efficacité bactéricide
selon la norme NF EN 14561(Mars 2007)
Application : désinfection d'instrument
1264+1265 neutralisant (pH4)
(Méthode par dilution/neutralisation)

DESTINATAIRE : CHRISTEYNS FRANCE

I- IDENTIFICATION DU DONNEUR D'ORDRE

Mr Jérôme DUBOURGEOIS
CHRISTEYNS FRANCE
31 rue de la Maladrie
44120 VERTOU
Tél. 02-40-80-27-27 - Fax. 02-40-03-09-73

II- IDENTIFICATION DE L'ECHANTILLON

- Nom du produit : **1264+1265 neutralisant (pH4)**
- Numéro de lot : PR171-F23 + PR171-N11
- Fabricant : CHRISTEYNS FRANCE
- Date de fabrication : 27/03/15
- Date de péremption : 27/09/16
- Date de réception au laboratoire : 02/04/15
- Aspect du mélange : liquide, limpide, incolore
- Conditions de stockage : à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Diluant du produit recommandé par le fabricant : non concerné
- Matière(s) active(s) : Non communiquées

RAPPORT D'ESSAI N°3602-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

III- METHODE D'ESSAI

Norme NF EN 14561 (Mars 2007) : « Essai quantitatif de porte germe pour l'évaluation de l'activité bactéricide pour instruments utilisés en médecine humaine ». (Phase 2, étape 2).

Réduction logarithmique au moins égale à 5 Log décimaux dans les conditions de l'essai.

IV- CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Période d'analyse : du 25/06/15 au 29/06/15
- Analyse réalisée par : M.TEULIER
- Diluant du produit utilisé au cours de l'essai : eau distillée
- Concentrations de produit testé (V/V) : 20 - 40 et 80%
- Aspect des dilutions : limpides
- Stabilité du mélange substance interférente/dilutions du produit/suspension microbienne : absence de précipité au cours de l'essai
- Méthode d'essai : dilution/neutralisation
- Temps de contact : 5 minutes (+/-10 secondes)
- Température d'essai : 20°C (+/-1°C)
- Substance interférente : Albumine bovine 0,3 g/l (conditions de propreté)
- Temps de séchage sur les supports :
  P.aeruginosa : 50 minutes à 30°C (+/-1°C)
  S.aureus : 30 minutes à 37°C (+/-1°C)
  E.hirae : 25 minutes à 37°C (+/-1°C)
- Température d'incubation : 37°C (+/-1°C)
- Identification des souches utilisées :
  - *Pseudomonas aeruginosa* DSM 939
  - *Staphylococcus aureus* DSM 799
  - *Enterococcus hirae* DSM 3320
- Neutralisant : 3% Polysorbate 80 ; 0,3% Lécithine d'œuf ; 15% Thiosulfate de sodium (stérilisé à 121°C pendant 20 minutes).

RAPPORT D'ESSAI N°3602-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

V- RESULTATS D'ESSAI

Vc : nombre de colonies comptées sur les boîtes,
N : nombre d'UFC / ml dans la suspension microbienne d'essai,
Nv : Nombre d'UFC/ml de la suspension microbienne de validation
Nv_0 : Nombre d'UFC/ml dans les mélanges A, B et C au début du temps de contact, est égal au 1/10 de Nv,
Na : Nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai,
Nw : nombre de survivants par ml dans le témoin d'eau,
A : nombre de survivants dans le témoin des conditions expérimentales,
B : nombre de survivants dans le témoin de neutralisant,
C : nombre de survivants dans le témoin de validation de la méthode,
R : réduction du nombre de cellules viables ($logR = LogN_w - LogN_a$)

RAPPORT D'ESSAI N°3602-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Pseudomonas aeruginosa DSM 939

Validation et témoins

Suspension de validation (Nv)		Témoin des conditions expérimentales (A)		Témoin de neutralisant (B)		Validation de la méthode (C à 80%)	
Vc	73 ; 75	Vc	85 ; 77	Vc	79 ; 85	Vc	77 ; 73
Nv = 740 - Nv_0 = 74		A= 81		B= 82		C = 75	

Essai validé si :
Nv compris entre 300 et 1600 UFC/ml
Nv_0 compris entre 30 et 160 UFC/ml
A, B et C supérieurs ou égaux à 0,5.Nv_0

Suspension d'essai

Suspension d'essai N	N	Vc	
	10^E-7	290 ; 288	N=2,96.10^9 LgN=9,47
	10^E-8	30 ; 43	

Témoin eau

Témoin d'eau Nw	Nw	Vc	
	10^E-4	190 ; 204	Nw= 2,02.10^7 LgNw= 7,31
	10^E-5	25 ; 26	

Essai validé si :
N compris entre 1,5.10^9 et 5.10^9 UFC/ml (9,17 ≤ lgN ≤ 9,70)
Nw n'est pas inférieur à 1,4.10^7 UFC/ml (lg Nw ≥ 7,15) et n'est pas supérieur à 0,05.N (lgNw ≤ (lgN-1,3))

Concentration produit (V/V)	Dilutions	Vc	Na	Réduction
20%	10^E0	<14 ; <14	Na < 140 lgNa < 2,15	lgR > 5,16
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		
40%	10^E0	<14 ; <14	Na < 140 lgNa < 2,15	lgR > 5,16
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		
80%	10^E0	<14 ; <14	Na < 140 lgNa < 2,15	lgR > 5,16
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		

RAPPORT D'ESSAI N°3602-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Staphylococcus aureus DSM 799

Validation et témoins

Suspension de validation (Nv)		Témoin des conditions expérimentales (A)		Témoin de neutralisant (B)		Validation de la méthode (C à 80%)	
Vc	96 ; 87	Vc	102 ; 103	Vc	109 ; 112	Vc	120 ; 122
Nv = 915 - Nv_0 = 92		A= 103		B= 111		C = 121	

Essai validé si :
Nv compris entre 300 et 1600 UFC/ml
Nv_0 compris entre 30 et 160 UFC/ml
A, B et C supérieurs ou égaux à 0,5.Nv_0

Suspension d'essai

Suspension d'essai N	N	Vc	
	10^E-7	424 ; 377	N=4,01.10^9 LgN= 9,60
	10^E-8	36 ; 46	

Témoin eau

Témoin d'eau Nw	Nw	Vc	
	10^E-4	> 660 ; > 660	Nw= 1,13.10^8 LgNw= 8,05
	10^E-5	115 ; 111	

Essai validé si :
N compris entre 1,5.10^9 et 5.10^9 UFC/ml (9,17 ≤ lgN ≤ 9,70)
Nw n'est pas inférieur à 1,4.10^7 UFC/ml (lg Nw ≥ 7,15) et n'est pas supérieur à 0,05.N (lgNw ≤ (lgN-1,3))

Concentration produit (V/V)	Dilutions	Vc	Na	Réduction
20%	10^E0	<14 ; <14	Na < 140 lgNa < 2,15	lgR > 5,90
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		
40%	10^E0	<14 ; <14	Na < 140 lgNa < 2,15	lgR > 5,90
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		
80%	10^E0	<14 ; <14	Na < 140 lgNa < 2,15	lgR > 5,90
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		

RAPPORT D'ESSAI N°3602-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Imprimé le : 29/06/15
Date de 1ère impression : 29/06/15

Enterococcus hirae DSM 3320

Validation et témoins

Suspension de validation (Nv)		Témoin des conditions expérimentales (A)		Témoin de neutralisant (B)		Validation de la méthode (C à 80%)	
Vc	92 ; 80	Vc	95 ; 99	Vc	106 ; 107	Vc	112 ; 100
$Nv = 860 - Nv_0 = 86$		A= 97		B= 107		C = 106	

Essai validé si :
Nv compris entre 300 et 1600 UFC/ml
Nv_0 compris entre 30 et 160 UFC/ml
A, B et C supérieurs ou égaux à $0,5.Nv_0$

Suspension d'essai

Suspension d'essai N	N	Vc	
	10^E-7	319 ; 290	N=$3,09.10^9$ LgN=9,49
	10^E-8	36 ; 35	

Témoin eau

Témoin d'eau Nw	Nw	Vc	
	10^E-4	225 ; 201	Nw= $2,19.10^7$ LgNw= 7,34
	10^E-5	30 ; 26	

Essai validé si :
N compris entre $1,5.10^9$ et 5.10^9 UFC/ml (9,17 ≤ lgN ≤ 9,70)
Nw n'est pas inférieur à $1,4.10^7$ UFC/ml (lg Nw ≥ 7,15) et n'est pas supérieur à 0,05.N (lgNw ≤ (lgN-1,3))

Concentration produit (V/V)	Dilutions	Vc	Na	Réduction
20%	10^E0	<14 ; <14	Na < 140 lgNa < 2,15	lgR > 5,19
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		
40%	10^E0	<14 ; <14	Na < 140 lgNa < 2,15	lgR > 5,19
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		
80%	10^E0	<14 ; <14	Na < 140 lgNa < 2,15	lgR > 5,19
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		

RAPPORT D'ESSAI N°3602-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

VI- CONCLUSION

Selon la méthodologie de la norme NF EN 14561 (Mars 2007), le lot PR171-F23 + PR171-N11 du produit : 1264+1265 neutralisant (pH4) de la société CHRISTEYNS FRANCE, dans les conditions d'essai suivantes :

- en 5 minutes de temps de contact,
- à la température d'essai de 20°C,
- en présence d'albumine bovine à 0,3 g/l (conditions de propreté),

présente une activité bactéricide sur les surfaces (réduction supérieure ou égale à 5 log décimaux), lorsqu'il est dilué à 20%, 40% et 80% (V/V), vis-à-vis des souches *Pseudomonas aeruginosa* DSM 939, *Staphylococcus aureus* DSM 799 et *Enterococcus hirae* DSM 3320.

Les souches sont conservées selon la norme NF EN 12353.
Les souches d'essai ont été soumises à essai une seule fois.

Commentaires :
Avant l'essai la solution 1264 a été neutralisée par la solution 1265 neutralisant selon le protocole suivant :
496,8g de 1264 + 24,5g de 1265 neutralisant (sous agitation)
pour l'essai sur *Pseudomonas aeruginosa* DSM 939 , le pH obtenu est de 4,05,
pour l'essai sur *Staphylococcus aureus* DSM 799 et *Enterococcus hirae* DSM 3320, le pH obtenu est de 4,13.

VII-SIGNATURES

Fait à DINARD, le 08/07/15

Rédigé par	Validé par
M.TEULIER Responsable d'essai	**M.SESQUES** Docteur en microbiologie Directeur technique **p/o P.FOUTEL** Responsable qualité

RAPPORT D'ESSAI N°3642-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Imprimé le : 29/05/15
Date de 1ère impression : 29/05/15

Test d'efficacité mycobactéricide
Méthodologie adaptée de la norme
NF EN 14348 (Juin 2005) par filtration sur membrane
1264+1265 neutralisant (pH4)

DESTINATAIRE : CHRISTEYNS FRANCE

I- IDENTIFICATION DU DONNEUR D'ORDRE

Mr. Jérôme DUBOURGEOIS
CHRISTEYNS FRANCE
31 rue de la Maladrie
44120 VERTOU
Tél. 02-40-80-27-27 Fax. 02-40-03-09-73

II- IDENTIFICATION DE L'ECHANTILLON

- Nom du produit : **1264+1265 neutralisant (pH4)**
- Numéro de lot : PR171-F23 + PR171-N11
- Fabricant : CHRISTEYNS FRANCE
- Date de fabrication : 27/03/15 pour les 2 produits
- Date de péremption : 27/09/16 pour les 2 produits
- Date de réception au laboratoire : 02/04/15
- Aspect du produit : mélange liquide, limpide, incolore
- Conditions de stockage : à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Diluant du produit recommandé par le fabricant : non concerné
- Matière(s) active(s) : Non communiquées

RAPPORT D'ESSAI N°3642-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

III- METHODE D'ESSAI

Méthodologie adaptée de la norme NF EN 14348 (Juin 2005) : Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité mycobactéricide des désinfectants chimiques utilisés en médecine, y compris les désinfectants pour instrument.

Lors d'essais antérieurs, plusieurs formules neutralisantes ont été testées sans obtenir de validation du test C (témoin d'inactivation par dilution/neutralisation).
L'essai est donc réalisé par filtration sur membrane selon une méthode adaptée (la norme NF EN 14348 ne mentionnant pas cette technique).

Réduction logarithmique au moins égale à 4 log décimaux dans les conditions de l'essai.

IV- CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Période d'analyse : du 06/05/15 au 27/05/15
- Analyse réalisée par : AF. GABILLET
- Diluant du produit utilisé au cours de l'essai : eau distillée
- Concentrations de produit testé (V/V) : 20-40 et 80%
- Aspect des dilutions : limpides
- Stabilité du mélange substance interférente/dilutions du produit/suspension microbienne : absence de précipité au cours de l'essai
- Temps de contact : 5 minutes (+/-10 secondes)
- Température d'essai : 20°C (+/-1°C)
- Substance interférente : Albumine bovine 0,3 g/l (conditions de propreté)
- Température d'incubation : 37°C (+/-1°C)
- Identification des souches utilisées :
  - *Mycobacterium terrae* CIP 104321
  - *Mycobacterium avium* DSM 44157

- Technique d'essai : filtration sur membrane

Des filtres en nitrate de cellulose de 47 mm de diamètre et de 0,45 microns de porosité sont utilisés. Le liquide de rinçage utilisé est de l'eau distillée.

RAPPORT D'ESSAI N°3642-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

En remplacement de l'étape de neutralisation décrite dans la norme NF EN 14348 (Juin 2005-§5.5.2.1-b), 100 µl du mélange d'essai sont déposés dans un entonnoir de filtration contenant 50 ml de liquide de rinçage,
Filtration (le temps de filtration est inférieur à 1 minute) puis 3 rinçages de 50 ml de liquide de rinçage sont réalisés,
Le filtre est ensuite déposé aseptiquement sur une boîte de Petri contenant 20 ml de gélose 7H10 additionnée de 10% de supplément OADC (MCO).

V- RESULTATS D'ESSAI

Vc : nombre de colonies comptées sur les boîtes,
N: nombre d'UFC / ml dans la suspension microbienne d'essai,
N_0: nombre de cellules par ml dans le mélange d'essai au début du temps de contact, il représente un dixième de N,
Nv : Nombre de cellules par ml de la suspension microbienne de validation. Il est 10 fois supérieur aux dénombrements en termes de valeurs de Vc en raison de l'étape de dilution à 10^{-1},
Nv_0 : Nombre de cellules par ml dans les mélanges A, B et C au début du temps de contact. Il représente un dixième de Nv,
Na : Nombre de survivants par ml dans le mélange d'essai à l'issue du temps de contact et avant neutralisation ou filtration sur membrane,
A : nombre de survivants dans le témoin des conditions expérimentales,
B : nombre de survivants dans le témoin du neutralisant ou du témoin de filtration,
C : nombre de survivants dans le témoin de validation de la méthode,
R : réduction du nombre de cellules viables ($R=N_0/Na$ ou $LogR=LogN_0-LogNa$).

LMH MICROBIOLOGY XPERT

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

RAPPORT D'ESSAI N°3642-1

Imprimé le : 29/05/15
Date de 1ère impression : 29/05/15

Essai sur *Mycobacterium terrae* CIP 104321

Souche testée	Suspension microbienne d'essai	Essai de validation			
		Suspension microbienne	Conditions expérimentales (A)	Témoin du neutralisant ou du témoin de filtration (B)	Inactivation par filtration sur membrane (C) pour 80%
Mycobacterium terrae CIP 104321 Lot 467	10^{-7} : Vc1 : 149 Vc2 : 138 10^{-8} : Vc1 : 19 Vc2 : 26 N= $1,51.10^9$ N_0= $1,51.10^8$ Log N_0 = 8,18	Vc1 : 38 Vc2 : 43 Nv= 405 Nv_0= 41	Vc : 34 A= 34	Vc : 26 B= 26	80% Vc : 37 C(80%) = 37
L'essai est validé si : *N est compris entre $1,5.10^9$ et 5.10^9 UFC/ml (9,17 ≤lg ≤9,70)* *N_0 est compris entre $1,5.10^8$ et 5.10^8 UFC/ml (8,17 ≤lg ≤8,70)* *N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml (N_v est compris entre 300 et 1600 UFC/ml)* *A, B, C est supérieur ou égal à 0,5xN_{v0}* *Le quotient des dénombrements obtenus par moyenne pondérée est compris entre 5 et 15*					

Souche testée	Concentrations testées % (V/V)											
		20%				40%				80%			
		10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Mycobacterium terrae CIP 104321 Lot 467	Vc	>165	>165	>165	>165	>165	>165	>165	65	7	0	0	0
	Na	>1,65.10^6.				6,50.10^5				<140			
	lg Na	>6,22				5,81				<2,15			
	Lg R	<1,96				2,37				>6,03			

RAPPORT D'ESSAI N°3642-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Essai sur *Mycobacterium avium* DSM 44157

Souche testée	Suspension microbienne d'essai	Essai de validation			
		Suspension microbienne	Conditions expérimentales (A)	Témoin du neutralisant ou du témoin de filtration (B)	Inactivation par filtration sur membrane (C) pour 80%
Mycobacterium avium DSM 44157 Lot 558	10^{-7} : Vc1 : 428 Vc2 : 464 10^{-8} : Vc1 : 72 Vc2 : 70 N= $4,70.10^9$ N_0= $4,70.10^8$ Log N_0 = 8,67	Vc1 : 105 Vc2 : 94 Nv= 995 Nv_0= 100	Vc : 87 A= 87	Vc : 101 B=101	80% Vc : 91 C(80%) = 91

L'essai est validé si :
N est compris entre $1,5.10^9$ et 5.10^9 UFC/ml (9,17 ≤lg ≤9,70)
N_0 est compris entre $1,5.10^8$ et 5.10^8 UFC/ml (8,17 ≤lg ≤8,70)
N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml (N_v est compris entre 300 et 1600 UFC/ml)
A, B, C est supérieur ou égal à 0,5xN_{v0}
Le quotient des dénombrements obtenus par moyenne pondérée est compris entre 5 et 15

Souche testée	Concentrations testées % (V/V)											
		20%				40%				80%			
		10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Mycobacterium avium DSM 44157 Lot 558	Vc	>165	>165	>165	>165	>165	14	0	0	0	0	0	0
	Na	>1,65.10^6.				1,40.10^3				<140			
	lg Na	>6,22				3,15				<2,15			
	Lg R	<2,45				5,52				>6,52			

RAPPORT D'ESSAI N°3642-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

VI- CONCLUSION

Selon la méthodologie adaptée de la norme NF EN 14348 (Juin 2005) par filtration sur membrane, le lot PR171-F23 + PR171-N11 du produit 1264+1265 neutralisant (pH4) de la société CHRISTEYNS FRANCE, dans les conditions d'essai suivantes :

- en 5 minutes de temps de contact,
- à la température d'essai de 20°C,
- en présence d'albumine bovine à 0,3 g/l (conditions de propreté),

présente une activité tuberculocide (réduction supérieure ou égale à 4 log décimaux), lorsqu'il est dilué à 80% (V/V), vis-à-vis de la souche *Mycobacterium terrae* CIP 104321.

présente une activité mycobactéricide (réduction supérieure ou égale à 4 log décimaux), lorsqu'il est dilué à 40% et 80% (V/V), vis-à-vis de la souche *Mycobacterium avium* DSM 44157.

Dans ces conditions d'essais, la concentration mycobactéricide du lot PR171-F23 + PR171-N11 du produit 1264+1265 neutralisant (pH4) est au final de 80% (V/V).

Les souches sont conservées selon la norme NF EN 12353.
Les souches d'essai ont été soumises à essai une seule fois.

Commentaires :
Avant l'essai la solution 1264 a été neutralisée par la solution 1265 neutralisant selon le protocole suivant :
496,8g de 1264 + 24,5g de 1265 neutralisant (sous agitation)
Pour l'essai , le pH obtenu est de 4,07.

RAPPORT D'ESSAI N°3642-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

VII-SIGNATURES

Fait à DINARD,

Rédigé par	Validé par
AF. GABILLET Responsable d'essai 01/6/2015	M.SESQUES Docteur en microbiologie Directeur technique p/o P. FOUTEL Responsable Qualité 2/06/15

LMH
Laboratoire Microbiologie et Hygiène
55 Boulevard Jules Verger - BP 10180
35803 DINARD CEDEX
Tél. 02 99 16 50 72 - Fax 02 99 16 52 75

RAPPORT D'ESSAI N°3607-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Imprimé le : 27/07/15
Date de 1ère impression : 27/07/15

Test d'efficacité mycobactéricide
selon la norme NF EN 14563 (Février 2009)
1264+1265 neutralisant (pH4)

DESTINATAIRE : CHRISTEYNS FRANCE

I- IDENTIFICATION DU DONNEUR D'ORDRE

Mr Jérôme DUBOURGEOIS
CHRISTEYNS FRANCE
31 rue de la Maladrie
44120 VERTOU
Tél. 02-40-80-27-27 - Fax. 02-40-03-09-73

II- IDENTIFICATION DE L'ECHANTILLON

- Nom du produit : **1264+1265 neutralisant (pH4)**
- Numéro de lot : PR171-F23 + PR171-N11
- Fabricant : CHRISTEYNS FRANCE
- Date de fabrication : 27/03/15
- Date de péremption : 27/09/16
- Date de réception au laboratoire : 02/04/15
- Aspect du mélange : limpide
- Conditions de stockage : à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Diluant du produit recommandé par le fabricant : non concerné
- Matière(s) active(s) : Non communiquées

RAPPORT D'ESSAI N°3607-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

III- METHODE D'ESSAI

Norme NF EN 14563 (Février 2009) : « Essai quantitatif de porte germe pour l'évaluation de l'activité mycobactéricide ou tuberculocide des désinfectants chimiques utilisés pour instruments en médecine humaine ». (Phase 2, étape 2).

Réduction logarithmique au moins égale à 4 Log décimaux dans les conditions de l'essai.

IV- CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Période d'analyse : du 25/06/15 au 16/07/15
- Analyse réalisée par : AF. GABILLET
- Diluant du produit utilisé au cours de l'essai : eau distillée
- Concentrations de produit testé (V/V) : 20%-40% et 80%
- Aspect des dilutions : limpides
- Stabilité du mélange substance interférente/dilutions du produit : absence de précipité au cours de l'essai
- Temps de contact : 5 minutes (+/-10 secondes)
- Température d'essai : 20°C (+/-1°C)
- Substance interférente : 0,3 g/l d'albumine bovine (conditions de propreté)
- Température d'incubation : 37°C (+/-1°C)
- Identification des souches utilisées :
  - *Mycobacterium terrae* CIP 104321
  - *Mycobacterium avium* DSM 44157
- Temps de séchage sur les supports :
  - *Mycobacterium terrae* CIP 104321 = 30 minutes à 37°C (+/-1°C)
  - *Mycobacterium avium* DSM 44157 = 40 minutes à 37°C (+/-1°C)
- Neutralisant (m/V) : 6% Polysorbate 80 ; 0,6% Lécithine d'œuf ; 0,5% Glycine ; 1% Thiosulfate de sodium ; 0,2% Peptone de caséine ; 1,8% Phosphate disodique ; 0,3% Phosphate monopotassique ; 1,7% Chlorure de sodium.

RAPPORT D'ESSAI N°3607-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

V- RESULTATS D'ESSAI

Vc : nombre de colonies comptées sur les boîtes,
N : nombre d'UFC / ml dans la suspension microbienne d'essai,
Nv : Nombre d'UFC/ml de la suspension microbienne de validation
Nv_0 : Nombre d'UFC/ml dans les mélanges A, B et C au début du temps de contact, est égal au 1/10 de Nv,
Na : Nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai,
Nw : nombre de survivants par ml dans le témoin d'eau,
A : nombre de survivants dans le témoin des conditions expérimentales,
B : nombre de survivants dans le témoin de neutralisant,
C : nombre de survivants dans le témoin de validation de la méthode,
R : réduction du nombre de cellules viables ($logR = LogN_w - LogN_a$)

RAPPORT D'ESSAI N°3607-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Mycobacterium terrae CIP 104321

Validation et témoins

Suspension de validation (Nv)		Témoin des conditions expérimentales (A)		Témoin de neutralisant (B)		Validation de la méthode (C)	
Vc	39 ;41	Vc	45 ;44	Vc	22 ;31	Vc	25 ;34 (20%) 21 ;22 (40%) 0 ;0 (80%)
Nv = 400 Nv_0 = 40		A= 45		B= 27		C(20%) = 30 C(40%) = 22 C(80%) = 0	

Essai validé si :
Nv compris entre 300 et 1600 UFC/ml
Nv_0 compris entre 30 et 160 UFC/ml
A, B et C supérieurs ou égaux à 0,5.Nv_0

Suspension d'essai

Suspension d'essai N	N	Vc	
	10^E-7	186 ;186	N = $1,99.10^9$ LgN = 9,30
	10^E-8	37 ;29	

Témoin eau

Témoin d'eau Nw	Nw	Vc	
	10^E-4	177 ;184	Nw = $2,00.10^7$ LgNw = 7,30
	10^E-5	40 ;40	

Essai validé si :
N compris entre $1,5.10^9$ et 5.10^9 UFC/ml (9,17 ≤ lgN ≤ 9,70)
Nw n'est pas inférieur à $1,4.10^6$ UFC/ml (lg Nw ≥ 6,15) et n'est pas supérieur à 0,05.N (lgNw ≤ (lgN-1,3))

Concentration produit (V/V)	Dilutions	Vc	Na	Réduction
20%	10^E0	>660 ;>660	Na = $6,55.10^3$ lgNa = 3,82	lgR = 3,48
	10^E-1	56 ;48		
	10^E-2	21 ;19		
	10^E-3	8 ;9		
40%	10^E0	<14 ; <14	Na <140 lgNa < 2,15	lgR > 5,15
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		
80%	10^E0	<14 ; <14	Concentration non interprétable car test C non validé pour cette concentration	
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		

RAPPORT D'ESSAI N°3607-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Mycobacterium avium DSM 44157

Validation et témoins

Suspension de validation (Nv)		Témoin des conditions expérimentales (A)		Témoin de neutralisant (B)		Validation de la méthode (C)	
Vc	94 ;85	Vc	86 ;92	Vc	85 ;99	Vc	42 ;52 (20%) 12 ;8 (40%) 2 ;8 (80%)
Nv = 895 Nv_0 =90		A= 89		B= 92		C(20%) = 47 C(40%) = 10 C(80%) = 5	

Essai validé si :
Nv compris entre 300 et 1600 UFC/ml
Nv_0 compris entre 30 et 160 UFC/ml
A, B et C supérieurs ou égaux à 0,5.Nv_0

Suspension d'essai

Suspension d'essai N	N	Vc	N=4,75.10^9 LgN=9,68
	10^E-7	>660 ;>660	
	10^E-8	54 ;41	

Témoin eau

Témoin d'eau Nw	Nw	Vc	Nw=2,48.10^7 LgNw = 7,39
	10^E-4	243 ;185	
	10^E-5	65 ;53	

Essai validé si :
N compris entre 1,5.10^9 et 5.10^9 UFC/ml (9,17 ≤ lgN ≤ 9,70)
Nw n'est pas inférieur à 1,4.10^6 UFC/ml (lg Nw ≥ 6,15) et n'est pas supérieur à 0,05.N (lgNw ≤ (lgN-1,3))

Concentration produit (V/V)	Dilutions	Vc	Na	Réduction
20%	10^E0	<14 ; <14	Na < 140 lgNa < 2,15	lgR > 5,24
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		
40%	10^E0	<14 ; <14	Concentrations non interprétables car tests C non validés pour ces concentrations	
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		
80%	10^E0	<14 ; <14		
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		

RAPPORT D'ESSAI N°3607-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

VI- CONCLUSION

Selon la méthodologie de la norme NF EN 14563 (Février 2009), le lot PR171-F23 + PR171-N11 du produit 1264+1265 neutralisant (pH4) de la société CHRISTEYNS FRANCE, dans les conditions d'essai suivantes :
- en 5 minutes de temps de contact,
- à la température d'essai de 20°C,
- en présence d'albumine bovine à 0,3 g/l (conditions de propreté),

présente une activité tuberculocide (réduction supérieure ou égale à 4 log décimaux) lorsqu'il est dilué à 40% (V/V) vis-à-vis de la souche *Mycobacterium terrae* CIP 104321.

présente une activité mycobactéricide (réduction supérieure ou égale à 4 log décimaux) à la fois vis-à-vis des souches *Mycobacterium avium* DSM 44157 et *Mycobacterium terrae* CIP 104321, lorsqu'il est dilué à 20% (V/V), vis-à-vis de la souche *Mycobacterium avium* DSM 44157 et 40 % vis-à-vis de la souche *Mycobacterium terrae* CIP 104321.

Les souches sont conservées et contrôlées selon la norme NF EN 12353.
Les souches d'essai ont été soumises à essai une seule fois.

Commentaires :
Avant l'essai la solution 1264 a été neutralisée par la solution 1265 neutralisant selon le protocole suivant :
496,8g de 1264 + 24,5g de 1265 neutralisant (sous agitation)
pour l'essai avec *Mycobacterium terrae* CIP 104321 , le pH obtenu est de 4,10,
pour l'essai avec *Mycobacterium avium* DSM 44157, le pH obtenu est de 4,13.

La concentration de 80% n'est pas interprétable pour la souche *Mycobacterium terrae* CIP 104321 car le test C (validation de l'inactivation par dilution/neutralisation) n'est pas validé pour cette concentration mais le test C est validé pour la concentration active de 40%.

Les concentrations de 40% et 80% ne sont pas interprétables pour la souche *Mycobacterium avium* DSM 44157 car les tests C (validation de l'inactivation par

RAPPORT D'ESSAI N°3607-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

dilution/neutralisation) ne sont pas validés pour ces concentrations mais le test C est validé pour la concentration active de 20%.

VII-SIGNATURES

Fait à DINARD,

Rédigé par	Validé par
AF. GABILLET Responsable d'essai 28/7/15	M.SESQUES Docteur en microbiologie Directeur technique p/o P. FOUTEL Responsable d'essai

LMH
Laboratoire Microbiologie et Hygiène
55 Boulevard Jules Verger - BP 10180
35803 DINARD CEDEX
Tél. 02 99 16 50 72 - Fax 02 99 16 52 75

RAPPORT D'ESSAI N°3603-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Imprimé le : 09/06/15
Date de 1ère impression : 09/06/15

Test d'efficacité fongicide
selon la norme NF EN 1275 (Avril 2006)
1264+1265 neutralisant (pH4)
(Méthode par dilution/neutralisation)

DESTINATAIRE : CHRISTEYNS FRANCE

I- IDENTIFICATION DU DONNEUR D'ORDRE

Mr Jérôme DUBOURGEOIS
CHRISTEYNS FRANCE
31 rue de la Maladrie
44120 VERTOU
Tél. 02-40-80-27-27 - Fax. 02-40-03-09-73

II- IDENTIFICATION DE L'ECHANTILLON

- Nom du produit : **1264+1265 neutralisant (pH4)**
- Numéro de lot : PR171-F23 + PR171-N11
- Fabricant : CHRISTEYNS FRANCE
- Date de fabrication : 27/03/15
- Date de péremption : 27/09/16
- Date de réception au laboratoire : 02/04/15
- Aspect du produit : Mélange limpide incolore
- Conditions de stockage : à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Diluant du produit recommandé par le fabricant : non concerné
- Matière(s) active(s) : Non communiquées

RAPPORT D'ESSAI N°3603-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

III- METHODE D'ESSAI

Norme NF EN 1275 (Avril 2006) : Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité levuricide ou fongicide de base des antiseptiques et des désinfectants chimiques.
Phase 1, étape 1.
Réduction logarithmique au moins égale à 4 log décimaux dans les conditions de l'essai.

IV- CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Période d'analyse : du 01/06/15 au 05/06/15
- Analyse réalisée par : AF. GABILLET
- Diluant du produit utilisé au cours de l'essai : eau distillée
- Concentrations de produit testé (V/V) : 20%-40% et 80%
- Technique d'essai : dilution/neutralisation
- Aspect des dilutions :limpides
- Stabilité et aspect du mélange: absence de précipité au cours de l'essai
- Temps de contact : 5 minutes (+/-10 secondes)
- Température d'essai : 30°C (+/-1°C)
- Température d'incubation : 30°C (+/-1°C)
- Identification des souches utilisées :
    - *Aspergillus brasiliensis* DSM 1988
    - *Candida albicans* DSM 1386

- Neutralisant : 3% Polysorbate 80 ; 0,3% Lécithine d'œuf ; 15% Thiosulfate de sodium (stérilisé à 121°C pendant 20 minutes).

RAPPORT D'ESSAI N°3603-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

V- RESULTATS D'ESSAI

Vc : nombre de colonies comptées sur les boîtes,
N: nombre d'UFC / ml dans la suspension microbienne d'essai,
N_0: nombre de cellules par ml dans le mélange d'essai au début du temps de contact, il représente un dixième de N,
Nv : Nombre de cellules par ml de la suspension microbienne de validation. Il est 10 fois supérieur aux dénombrements en termes de valeurs de Vc en raison de l'étape de dilution à 10^{-1},
Nv_0 : Nombre de cellules par ml dans les mélanges A, B et C au début du temps de contact. Il représente un dixième de Nv,
Na : Nombre de survivants par ml dans le mélange d'essai à l'issue du temps de contact et avant neutralisation ou filtration sur membrane,
A : nombre de survivants dans le témoin des conditions expérimentales,
B : nombre de survivants dans le témoin du neutralisant ou du témoin de filtration,
C : nombre de survivants dans le témoin de validation de la méthode,
R : réduction du nombre de cellules viables ($R=N_0/Na$ ou $LogR=LogN_0-LogNa$).

RAPPORT D'ESSAI N°3603-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Essai sur *Aspergillus brasiliensis (ex niger) DSM 1988*

Souche testée	Suspension microbienne d'essai	Essai de validation			
		Suspension microbienne	Conditions expérimentales (A)	Témoin du neutralisant ou du témoin de filtration (B)	Inactivation par neutralisation ou par filtration sur membrane (C) (pour 80%)
Aspergillus brasiliensis (ex niger) DSM 1988 Lot 533 *Le pourcentage de spores échinulées obtenu est supérieur à 75%.*	10^{-5} : Vc1 : >165 Vc2 : >165 10^{-6} : Vc1 : 15 Vc2 : 16 N= $1,55.10^7$ N_0= $1,55.10^6$ Log N_0 = 6,19	Vc1 : 34 Vc2 : 31 Nv= 325 Nv_0= 33	Vc1 : 28 Vc2 : 31 A= 30	Vc1 : 24 Vc2 : 29 B= 27	Vc1 : 24 Vc2 :28 C= 26

L'essai est validé si :
N est compris entre $1,5.10^7$ et 5.10^7 UFC/ml (7,17 ≤lg ≤7,70)
N_0 est compris entre $1,5.10^6$ et 5.10^6 UFC/ml (6,17 ≤lg ≤6,70)
N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml (N_v est compris entre 300 et 1600 UFC/ml)
A, B, C est supérieur ou égal à 0,5xN_{v0}
Le quotient des dénombrements obtenus par moyenne pondérée est compris entre 5 et 15

Souche testée		Concentrations testées % (V/V)				
		20%	40%	80%		
Aspergillus brasiliensis (ex niger) DSM 1988 Lot 533	Vc	>165;>165	16;10	0;0		
	Na Log N_a	>1650 >3,22	<150 <2,18	<140 <2,15		
	R	<2,97	>4,01	>4,04		

RAPPORT D'ESSAI N°3603-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Essai sur *Candida albicans* DSM 1386

Souche testée	Suspension microbienne d'essai	Essai de validation			
		Suspension microbienne	Conditions expérimentales (A)	Témoin du neutralisant ou du témoin de filtration (B)	Inactivation par neutralisation ou par filtration sur membrane (C) (pour 80%)
Candida albicans DSM 1386 Lot 534	10^{-5} : Vc1 : >330 Vc2 : >330 10^{-6} : Vc1 : 31 Vc2 : 45 N= $3,80.10^7$ N_0= $3,80.10^6$ Log N_0 =6,58	Vc1 : 65 Vc2 : 67 Nv= 660 Nv_0= 66	Vc1 : 52 Vc2 : 53 A= 53	Vc1 : 56 Vc2 : 48 B= 52	Vc1 : 78 Vc2 : 75 C= 77

L'essai est validé si :
N est compris entre $1,5.10^7$ et 5.10^7 UFC/ml ($7,17 \leq lg \leq 7,70$)
N_0 est compris entre $1,5.10^6$ et 5.10^6 UFC/ml ($6,17 \leq lg \leq 6,70$)
N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml (N_v est compris entre 300 et 1600 UFC/ml)
A, B, C est supérieur ou égal à $0,5xN_{v0}$
Le quotient des dénombrements obtenus par moyenne pondérée est compris entre 5 et 15

Souche testée	Concentrations testées % (V/V)					
		20%	40%	80%		
Candida albicans DSM 1386 Lot 534	Vc	0;0	0;0	0;0		
	Na Log N_a	<140 <2,15	<140 <2,15	<140 <2,15		
	R	>4,43	>4,43	>4,43		

RAPPORT D'ESSAI N°3603-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

VI- CONCLUSION

Selon la méthodologie de la norme NF EN 1275 (Avril 2006), le lot PR171-F23 + PR171-N11 du produit 1264+1265 neutralisant (pH4) de la société CHRISTEYNS FRANCE, dans les conditions d'essai suivantes :

- en 5 minutes de temps de contact,
- à la température d'essai de 20°C,

présente une activité levuricide (réduction supérieure à 4 log décimaux), lorsqu'il est dilué à 20%, 40% et 80% (V/V), vis-à-vis de la souche *Candida albicans* DSM 1386.

présente une activité fongicide (réduction supérieure à 4 log décimaux), lorsqu'il est dilué à 40% et 80% (V/V), vis-à-vis de la souche *Aspergillus brasiliensis (ex niger)* DSM 1988.

Dans ces conditions d'essais, les concentrations efficaces fongicides du lot PR171-F23 + PR171-N11 du produit 1264+1265 neutralisant (pH4) sont au final de 40% et 80%(V/V) vis-à-vis des 2 souches.

Les souches sont conservées et contrôlées selon la norme NF EN 12353.
Les souches d'essai ont été soumises à essai une seule fois.

Commentaires :
Avant l'essai la solution 1264 a été neutralisée par la solution 1265 neutralisant selon le protocole suivant :
496,8g de 1264 + 24,5g de 1265 neutralisant (sous agitation)
pour l'essai sur *Candida albicans* DSM 1386 , le pH obtenu est de 4,09
pour l'essai sur *Aspergillus brasiliensis* (ex *niger*) DSM 1988, le pH obtenu est de 4,23.

RAPPORT D'ESSAI N°3603-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

VII-SIGNATURES

Fait à DINARD,

Rédigé par	Validé par
AF. GABILLET Responsable d'essai	M.SESQUES Docteur en microbiologie Directeur technique p/o P. FOUTEL Responsable Qualité

RAPPORT D'ESSAI N°3604-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Imprimé le : 24/04/15
Date de 1ère impression : 24/04/15

TEST D'EFFICACITE FONGICIDE
SELON LA NORME NF EN 13624 (Novembre 2013)
1264+1265 neutralisant (pH4)
Application = Désinfection d'instrument
(Méthode par filtration sur membrane)

DESTINATAIRE : CHRISTEYNS FRANCE

I- IDENTIFICATION DU DONNEUR D'ORDRE

Mr Jérôme DUBOURGEOIS
CHRISTEYNS FRANCE
31 rue de la Maladrie
44120 VERTOU
Tél. 02-40-80-27-27 - Fax. 02-40-03-09-73

ACCREDITATION
N° 1-1308
PORTEE DISPONIBLE
SUR WWW.COFRAC.FR

L'accréditation de la section Essais du COFRAC atteste de la compétence des Laboratoires pour les seuls essais couverts par l'accréditation. Si des modifications particulières ont été introduites dans la méthode d'essai indiquée, ces modifications ou spécifications sont précisées dans le paragraphe Commentaires en fin du rapport d'essai

Ce rapport d'essai ne concerne que le produit soumis à l'essai

Il comporte 7 pages (cette page comprise).

RAPPORT D'ESSAI N°3604-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

II- IDENTIFICATION DE L'ECHANTILLON

- Nom du produit : **1264+1265 neutralisant (pH4)**
- Numéro de lot : PR171-F23 + PR171-N11
- Fabricant : CHRISTEYNS FRANCE
- Date de fabrication : 27/03/15
- Date de péremption : 27/09/16
- Date de réception au laboratoire : 02/04/15
- Aspect du produit : Mélange limpide incolore
- Conditions de stockage : à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Diluant du produit recommandé par le fabricant : non concerné
- Matière(s) active(s) : Non communiquées

III- METHODE D'ESSAI

Norme NF EN 13624 (Novembre 2013) : Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide en médecine. (Phase 2, Etape 1).

Application « Désinfection d'instrument » : Réduction logarithmique au moins égale à 4 Log décimaux dans les conditions de l'essai.

Liquide de rinçage : Eau distillée

IV- CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Période d'analyse : du 20/04/15 au 24/04/15
- Analyse réalisée par : AF. GABILLET
- Diluant du produit utilisé au cours de l'essai : eau distillée
- Concentrations de produit testé (V/V) : 20-40 et 80%

RAPPORT D'ESSAI N°3604-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

- Technique d'essai : filtration sur membrane
- Aspect des dilutions : Limpides
- Stabilité du mélange substance interférente/dilutions du produit : absence de précipité au cours de l'essai
- Temps de contact : 5 minutes (+/-10 secondes)
- Température d'essai : 20°C (+/-1°C)
- Substance interférente : 0,3 g/l d'albumine bovine (conditions de propreté)
- Température d'incubation : 30°C (+/-1°C)
- Identification de la souche utilisée :
  Candida albicans DSM 1386
  Aspergillus brasiliensis (ex *niger*) DSM 1988

V- RESULTATS D'ESSAI

Vc : nombre de colonies comptées sur les boîtes,
N: nombre d'UFC / ml dans la suspension microbienne d'essai,
N_0: nombre de cellules par ml dans le mélange d'essai au début du temps de contact, il représente un dixième de N,
Nv : nombre de cellules par ml de la suspension microbienne de validation,
Nv_0 : nombre de cellules par ml dans les mélanges A, B et C au début du temps de contact. Il représente un dixième de Nv,
Nv_B : dans le cas du témoin de neutralisant B, il s'agit du nombre de cellules par ml après dilution au centième. Il représente un millième de Nv,
Na : nombre de survivants par ml dans le mélange d'essai à l'issue du temps de contact et avant neutralisation
A : nombre de survivants dans le témoin des conditions expérimentales,
B : nombre de survivants dans le témoin de neutralisant,
C : nombre de survivants dans le témoin de validation de la méthode,
R : réduction du nombre de cellules viables ($R=N_0/Na$) exprimé en logarithme

RAPPORT D'ESSAI N°3604-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Essai sur *Candida albicans DSM 1386*

Souche testée	Suspension microbienne d'essai	Essai de validation				
		Suspension microbienne (NV)	Suspension microbienne (NVB)	Conditions expérimentales (A)	Non toxicité du neutralisant (B)	Inactivation par dilution/neutralisation (C)
Candida albicans DSM 1386 Lot 534	10^{-5} : Vc1 : 241 Vc2 : 233 10^{-6} : Vc1 : 31 Vc2 : 32 N= 2,44.10^7 N_0= 2,44.10^6 Log N_0 =6,39	Vc1 : 61 Vc2 : 58 (dilution 10^{-1}) Nv= 595 Nv_0= 60		Vc1 : 58 Vc2 : 63 A= 61	Vc1 : 47 Vc2 : 41 B= 44	Vc1 : 54 Vc2 : 47 C= 51

L'essai est validé si :
N est compris entre 1,5.10^7 et 5.10^7 UFC/ml (7,17 ≤ lg N ≤ 7,70)
N_0 est compris entre 1,5.10^6 et 5.10^6 UFC/ml (6,17 ≤ lg N ≤ 6,70)
N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml (N_v est compris entre 300 et 1600 UFC/ml)
Nv_B est compris entre 3,0.10^4 et 1,6.10^5
A,B et C sont supérieurs ou égaux à 0,5xN_{v0}
B (dilution-neutralisation) est égal ou supérieur à 0,0005 x Nv_B
Le quotient des dénombrements obtenus par moyenne pondérée est compris entre 5 et 15

Souche testée	Concentrations testées % (V/V)									
		20%			40%			80%		
		10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^0	10^{-1}	10^{-2}
Candida albicans DSM 1386 Lot 534	Vc1 Vc2	0 0			0 0			0 0		
	Na	<140			<140			<140		
	lg Na	<2,15			<2,15			<2,15		
	Lg R	>4,24			>4,24			>4,24		

RAPPORT D'ESSAI N°3604-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Essai sur *Aspergillus brasiliensis (ex niger)* DSM 1988

Souche testée	Suspension microbienne d'essai	Essai de validation				
		Suspension microbienne (NV)	Suspension microbienne (NVB)	Conditions expérimentales (A)	Non toxicité du neutralisant (B)	Inactivation par dilution/neutralisation (C)
Aspergillus brasiliensis (ex niger) DSM 1988 Lot 533 *Le pourcentage de spores échinulées obtenu est supérieur à 75%.*	10^{-5} : Vc1 : 156 Vc2 : 156 10^{-6} : Vc1 : 15 Vc2 : 16 N= 1,56.10^7 N_0= 1,56.10^6 Log N_0 =6,19	Vc1 : 49 Vc2 : 44 (dilution 10^{-1}) Nv= 465 Nv_0= 47		Vc1 : 38 Vc2 : 28 A= 33	Vc1 : 29 Vc2 : 22 B= 26	Vc1 : 25 Vc2 : 26 C= 26

L'essai est validé si :
N est compris entre 1,5.10^7 et 5.10^7 UFC/ml (7,17 ≤ lg N ≤ 7,70)
N_0 est compris entre 1,5.10^6 et 5.10^6 UFC/ml (6,17 ≤ lg N ≤ 6,70)
N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml (N_v est compris entre 300 et 1600 UFC/ml)
Nv_B est compris entre 3,0.10^4 et 1,6.10^5
A,B et C sont supérieurs ou égaux à 0,5xN_{v0}
B (dilution-neutralisation) est égal ou supérieur à 0,0005 x Nv_B
Le quotient des dénombrements obtenus par moyenne pondérée est compris entre 5 et 15

Souche testée	Concentrations testées % (V/V)									
		20%			40%			80%		
Aspergillus brasiliensis (ex niger) DSM 1988 Lot 533		10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^0	10^{-1}	10^{-2}
	Vc1 Vc2	>55 >55			45 >55			0 0		
	Na	>550			>500			<140		
	lg Na	>2,74			>2,70			<2,15		
	Lg R	<3,45			<3,49			>4,04		

RAPPORT D'ESSAI N°3604-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

VI- CONCLUSION

Conformément à la norme NF EN 13624 (Novembre 2013), le lot PR171-F23 + PR171-N11 du produit 1264+1265 neutralisant (pH4) de la société CHRISTEYNS FRANCE, dans les conditions d'essai suivantes :

- en 5 minutes de temps de contact,
- à la température de 20°C,
- en présence d'albumine bovine à 0,3 g/l (conditions de propreté),

présente une activité levuricide (réduction supérieure à 4 log décimaux dans le cas de l'application « Désinfection d'instrument »), lorsqu'il est dilué à 20%, 40% et 80% (V/V), vis-à-vis de la souche *Candida albicans* DSM 1386.

présente une activité fongicide (réduction supérieure à 4 log décimaux dans le cas de l'application « Désinfection d'instrument »), lorsqu'il est dilué à 80% (V/V), vis-à-vis de la souche *Aspergillus brasiliensis (ex niger)* DSM 1988.

Dans ces conditions d'essais, la concentration efficace du lot PR171-F23 + PR171-N11 du produit 1264+1265 neutralisant (pH4) est au final de 80% (V/V).

Commentaires (non couverts par l'accréditation) :
Avant l'essai la solution 1264 a été neutralisée par la solution 1265 neutralisant selon le protocole suivant :
496,8g de 1264 + 24,5g de 1265 neutralisant (sous agitation)
pour l'essai sur *Candida albicans* DSM 1386 , le pH obtenu est de 4,13,
pour l'essai sur *Aspergillus brasiliensis* (ex *niger*) DSM 1988, le pH obtenu est de 4,09.

RAPPORT D'ESSAI N°3604-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

VII-SIGNATURES

Fait à DINARD, le

Rédigé par	Validé par
AF. GABILLET Responsable d'essai	M.SESQUES Docteur en microbiologie Directeur technique

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

RAPPORT D'ESSAI N°3605-1

Imprimé le : 13/07/15
Date de 1ère impression : 13/07/15

Test d'efficacité fongicide
selon la norme NF EN 14562 (Septembre 2006)
Application : désinfection d'instrument
1264+1265 neutralisant (pH4)
(Méthode par dilution/neutralisation)

DESTINATAIRE : CHRISTEYNS FRANCE

I- IDENTIFICATION DU DONNEUR D'ORDRE

Mr Jérôme DUBOURGEOIS
CHRISTEYNS FRANCE
31 rue de la Maladrie
44120 VERTOU
Tél. 02-40-80-27-27 - Fax. 02-40-03-09-73

II- IDENTIFICATION DE L'ECHANTILLON

- Nom du produit : **1264+1265 neutralisant (pH4)**
- Numéro de lot : PR171-F23 + PR171-N11
- Fabricant : CHRISTEYNS FRANCE
- Date de fabrication : 27/03/15
- Date de péremption : 27/09/16
- Date de réception au laboratoire : 02/04/15
- Aspect du mélange : liquide, limpide, incolore
- Conditions de stockage : à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Diluant du produit recommandé par le fabricant : non concerné
- Matière(s) active(s) : Non communiquées

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

RAPPORT D'ESSAI N°3605-1

III- METHODE D'ESSAI

Norme NF EN 14562 (Septembre 2006) : « Essai quantitatif de porte germe pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide pour instruments utilisés en médecine humaine ». (Phase 2, étape 2).

Réduction logarithmique au moins égale à 4 Log décimaux dans les conditions de l'essai.

IV- CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Période d'analyse : du 01/07/15 au 10/07/15
- Analyse réalisée par : M.TEULIER
- Diluant du produit utilisé au cours de l'essai : eau distillée
- Concentrations de produit testé (V/V) : 20 - 40 et 80%
- Aspect des dilutions : limpides
- Stabilité du mélange substance interférente/dilutions du produit/suspension microbienne : absence de précipité au cours de l'essai
- Méthode d'essai : dilution/neutralisation
- Temps de contact : 5 minutes (+/-10 secondes)
- Température d'essai : 20°C (+/-1°C)
- Substance interférente : Albumine bovine 0,3 g/l (conditions de propreté)
- Temps de séchage sur les supports :
  C.albicans : 40 minutes à 37°C (+/-1°C)
  A. brasiliensis : 45 minutes à 37°C (+/-1°C)
- Température d'incubation : 30°C (+/-1°C)
- Identification des souches utilisées :
  - *Candida albicans* DSM 1386
  - *Aspergillus brasiliensis (ex niger)* DSM 1988
- Neutralisant (m/V): 3% Polysorbate 80 ; 0,3% Lécithine d'œuf ; 15% Thiosulfate de sodium (stérilisé à 121°C pendant 20 minutes).

RAPPORT D'ESSAI N°3605-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

V- RESULTATS D'ESSAI

Vc : nombre de colonies comptées sur les boîtes,
N : nombre d'UFC / ml dans la suspension microbienne d'essai,
Nv : Nombre d'UFC/ml de la suspension microbienne de validation
Nv_0 : Nombre d'UFC/ml dans les mélanges A, B et C au début du temps de contact, est égal au 1/10 de Nv,
Na : Nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai,
Nw : nombre de survivants par ml dans le témoin d'eau,
A : nombre de survivants dans le témoin des conditions expérimentales,
B : nombre de survivants dans le témoin de neutralisant,
C : nombre de survivants dans le témoin de validation de la méthode,
R : réduction du nombre de cellules viables ($logR = LogN_w - LogN_a$)

RAPPORT D'ESSAI N°3605-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

Candida albicans DSM 1386

Validation et témoins

Suspension de validation (Nv)		Témoin des conditions expérimentales (A)		Témoin de neutralisant (B)		Validation de la méthode (C) pour 80%	
Vc	60 ; 63	Vc	56 ; 54	Vc	48 ; 57	Vc	55 ; 49
Nv = 615 Nv_0 = 62		A= 55		B= 53		C= 52	

Essai validé si :
Nv compris entre 300 et 1600 UFC/ml
Nv_0 compris entre 30 et 160 UFC/ml
A, B et C supérieurs ou égaux à 0,5.Nv_0

Suspension d'essai

Suspension d'essai N	N	Vc	
	10^E-6	183 ; 162	N = $1,86.10^8$ LgN = 8,27
	10^E-7	30 ; 35	

Témoin eau

Témoin d'eau Nw	Nw	Vc	
	10^E-3	161 ; 155	Nw = $1,59.10^6$ LgNw = 6,20
	10^E-4	18 ; 16	

Essai validé si :
N compris entre $1,5.10^8$ et 5.10^8 UFC/ml (8,17 ≤ lgN ≤ 8,70)
Nw n'est pas inférieur à $1,4.10^6$ UFC/ml (lg Nw ≥ 6,15) et n'est pas supérieur à 0,05.N (lgNw ≤ (lgN-1,3))

Concentration produit (V/V)	Dilutions	Vc	Na	Réduction
20%	10^E0	<14 ; <14	Na <140 lgNa < 2,15	lgR > 4,05
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		
40%	10^E0	<14 ; <14	Na <140 lgNa < 2,15	lgR > 4,05
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		
80%	10^E0	<14 ; <14	Na <140 lgNa < 2,15	lgR > 4,05
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

RAPPORT D'ESSAI N°3605-1

Imprimé le : 13/07/15
Date de 1ère impression : 13/07/15

Aspergillus brasiliensis (ex niger) DSM 1988

Validation et témoins

Suspension de validation (Nv)		Témoin des conditions expérimentales (A)		Témoin de neutralisant (B)		Validation de la méthode (C) pour 80%	
Vc	47 ; 50	Vc	42 ; 48	Vc	43 ; 42	Vc	53 ; 51
Nv = 485 Nv_0 = 49		A= 45		B= 43		C= 52	

Essai validé si :
Nv compris entre 300 et 1600 UFC/ml
Nv_0 compris entre 30 et 160 UFC/ml
A, B et C supérieurs ou égaux à 0,5.Nv_0

Suspension d'essai

Suspension d'essai N	N	Vc	N = 1,61.10^8 LgN = 8,21
	10^E-6	150 ; 162	
	10^E-7	24 ; 18	

Témoin eau

Témoin d'eau Nw	Nw	Vc	Nw = 2,10.10^6 LgNw = 6,32
	10^E-3	199 ; 195	
	10^E-4	31 ; 37	

Essai validé si :
N compris entre 1,5.10^8 et 5.10^8 UFC/ml (8,17 ≤ lgN ≤ 8,70)
Nw n'est pas inférieur à 1,4.10^6 UFC/ml (lg Nw ≥ 6,15) et n'est pas supérieur à 0,05.N (lgNw ≤ (lgN-1,3))

Concentration produit (V/V)	Dilutions	Vc	Na	Réduction
20%	10^E0	>330 ;>330	Na = 1,65.10^4 lgNa = 4,22	lgR = 2,10
	10^E-1	151 ; 170		
	10^E-2	20 ; 21		
	10^E-3	10 ; 6		
40%	10^E0	<14 ; <14	Na <140 lgNa < 2,15	lgR = > 4,17
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		
80%	10^E0	<14 ; <14	Na <140 lgNa < 2,15	lgR > 4,17
	10^E-1	<14 ; <14		
	10^E-2	<14 ; <14		
	10^E-3	<14 ; <14		

LMH MICROBIOLOGY XPERT

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

RAPPORT D'ESSAI N°3605-1

VI- CONCLUSION

Selon la méthodologie de la norme NF EN 14562 (Septembre 2006), le lot PR171-F23 + PR171-N11 du produit 1264+1265 neutralisant (pH4) de la société CHRISTEYNS FRANCE, dans les conditions d'essai suivantes :

- en 5 minutes de temps de contact,
- à la température d'essai de 20°C,
- en présence d'albumine bovine à 0,3 g/l (conditions de propreté),

  - présente une activité levuricide (réduction supérieure ou égale à 4 Log décimaux), lorsqu'il est dilué à 20%, 40% et 80% (V/V), vis-à-vis de la souche *Candida albicans* DSM 1386,
  - présente une activité fongicide (réduction supérieure ou égale à 4 Log décimaux), lorsqu'il est dilué à 40% et 80% (V/V), vis-à-vis de la souche *Aspergillus brasiliensis (ex niger)* DSM 1988.

Dans ces conditions d'essais, les concentrations efficaces fongicides du lot PR171-F23 + PR171-N11 du produit 1264+1265 neutralisant (pH4) sont au final de 40% et 80% (V/V) vis-à-vis des souches *Candida albicans* DSM 1386 et *Aspergillus brasiliensis (ex niger)* DSM 1988.

Les souches sont conservées et contrôlées selon la norme NF EN 12353.
Les souches d'essai ont été soumises à essai une seule fois.

Commentaires :
Avant l'essai la solution 1264 a été neutralisée par la solution 1265 neutralisant selon le protocole suivant : 496,8g de 1264 + 24,5g de 1265 neutralisant (sous agitation).
- pour l'essai sur *Candida albicans* DSM 1386, le pH obtenu est de 4,01,
- pour l'essai sur *Aspergillus brasiliensis (ex niger)* DSM 1988, le pH obtenu est de 4,03.

RAPPORT D'ESSAI N°3605-1

55 Boulevard Jules Verger
35803 DINARD Cedex
Tél. 02 99 16 50 72
Fax. 02 99 16 52 75

VII-SIGNATURES

Fait à DINARD,

Rédigé par	Validé par
M.TEULIER Responsable d'essai 15/07/15	M.SESQUES Docteur en microbiologie Directeur technique p/p : P.FOUTEL Responsable qualité 4.08.2015

LMH
Laboratoire Microbiologie et Hygiène
55 Boulevard Jules Verger - BP 10180
35803 DINARD CEDEX
Tél. 02 99 16 50 72 - Fax 02 99 16 52 75

DR. BRILL + DR. STEINMANN
INSTITUTE FOR HYGIENE AND MICROBIOLOGY

Dr. Brill + Partner GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

Tel: +49 (421) 27819102
Fax: +49 (421) 2760283
E-mail: jochen.steinmann@brillhygiene.com
http://www.brillhygiene.com

Christeyns France
Rue de la maladrie 31
FR – 44120 Vertou

Ihre Zeichen, Ihre Nachrichten vom | Unsere Zeichen, unsere Nachricht vom | Bremen ,den 31.05.2015

Summary: virus-inactivating properties of 1264+1265 of Christeyns France according to EN 14476:2013

This summary is based on the following test reports of Dr. Brill + Partner GmbH for the surface disinfectant 1264+1265 produced by Christeyns France for surface disinfection:

poliovirus test report 14.05.2015

adenovirus test report 23.06.2015

MNV test report 08.06.2015

The following concentration and exposure time are necessary for the inactivation of the three test viruses:

undiluted 5 minutes

in order to achieve a four $\log_{10}$ reduction (inactivation $\geq$ 99.99 %) under clean conditions in a quantitative suspension test according to EN 1447:2013.

After evaluation with poliovirus type 1, adenovirus type 5 and MNV the surface disinfectant 1264+1265 can be declared as having "**virucidal**" properties according to EN 14476:2013.

This declaration is explained in the EN 14476:2013 as follows:

1 Scope

This European Standard specifies a test method and the minimum requirements for virucidal activity of chemical disinfectant and antiseptic products that form a homogeneous physically stable preparation when diluted with hard water – or in the case of ready-to-use products, i. e, products that are not diluted when applied,– with water. Products can only be tested at a concentration of 80 % (97 %, with a modified method for special cases) as some dilution is always produced by adding the test organisms and interfering substance.

This European Standard applies to products that are used in the medical area in the fields of hygienic handrub, hygienic handwash, instrument disinfection by immersion, surface disinfection by wiping, spraying, flooding or other means and textile disinfection.

This European Standard applies to areas and situations where disinfection is medically indicated. Such indications occur in patient care, for example:

— in hospitals, in community medical facilities, and in dental institutions;

— in clinics of schools, of kindergartens, and of nursing homes;

and may occur in the workplace and in the home. It may also include services such as laundries and kitchens supplying products directly for the patients.

NOTE 1 The method described is intended to determine the activity of commercial formulations or active substances under the conditions in which they are used.

NOTE 2 This method corresponds to a phase 2, step 1 test.

NOTE 3 EN 14885 specifies in detail the relationship of the various tests to one another and to "use recommendations".

Dr. Jochen Steinmann

From Annex B in EN 14476:
Examples of viruses which may contaminate human medical instruments, hands, surfaces
(*Enveloped viruses are in bold*)

NOTE This list is not exhaustive.

Blood

Enterovirus
Filoviridae
Flavivirus
Herpesviridae
Hepatitis A Virus (HAV)
Hepatitis B virus (HBV)
Hepatitis C virus (HCV)
Hepatitis Delta virus (HDV)
Human Immunodeficiency Virus (HIV)
Human T Cell Leukemia Virus (HTLV)
Parvovirus B 19

Respiratory tract

Adenovirus (Mast-)
Coronavirus
Enterovirus
Herpesviridae
Influenza Virus
Paramyxoviridae
Rhinovirus
Rubella Virus

Neural tissue, ear & nose, eye

Adenovirus (Mast-)
Enterovirus
Herpesviridae
Measles Virus
Human Immunodeficiency Virus (HIV)
Polyomavirus
Rabies Virus
Rubella Virus

Gastro-intestinal

Adenovirus(Mast-)
Caliciviridae
Coronavirus
Astrovirus
Enterovirus
Hepatitis A Virus (HAV)
Hepatitis E Virus (HEV)
Rotavirus

Skin, breast and/or milk

Enterovirus
Herpesviridae
Human Immunodeficiency Virus (HIV)
Human T Cell Leukemia Virus (HTLV)
Papillomavirus
Poxviridae

Spleen and lymph nodes (see also „Blood")

Human T Cell Leukemia Virus (HTLV)
Human Immunodeficiency Virus (HIV)

Dental procedure

Adenovirus(Mast-)
Enterovirus
Herpesviridae
Hepatitis C Virus (HCV)
Hepatitis Delta Virus (HDV)
Human Immunodeficiency Virus (HIV)

Hepatitis B virus (HBV)

Urogenital tract

Hepatitis B Virus (HBV)
Herpesviridae
Human Immunodeficiency Virus (HIV)
Human T Cell Leukemia Virus (HTLV)
Papillomavirus
Polyomavirus

Reference:
Van Regenmortel MHV et al.,Eds.: Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, seventh report of the international committee on taxonomy of viruses.
Academic Press, San Diego, 2000

DR. BRILL + DR. STEINMANN
INSTITUT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE

ilac-MRA DAkkS Deutsche Akkreditierungsstelle D-PL-13412-01-02
Anerkannt durch/Recognized by Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten www.zlg.de
ZLG-AP-306.10.31

TEST REPORT

23.06.2015

Test report C15L0161A

Evaluation of the effectiveness of

1264+1265

Test virus: adenovirus type 5

Method: EN 14476:2013

quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine

Sponsor:
Christeyns France
Rue de la maladrie 31
FR – 44120 Vertou

Norderoog 2, D - 28259 Bremen
Tel.: +49 421-27819102, Fax: +49 421-2760283
info@brillhygiene.com, http://www.brillhygiene.com

1. Identification of test laboratory

Dr. Brill + Partner GmbH Institute for Hygiene and Microbiology, Norderoog 2, DE - 28259 Bremen

2. Identification of sample

2.1 Component a

Manufacturer	Christeyns France
Name of product	1264
Product diluent recommended by the manufacturer	-
Batch number	PR171-23
Application	surface disinfectant
Production date	12.03.2015
Expiry date	-
Active compound (s) (100 g)	acetic acid hydrogen peroxide peracetic acid
Appearance, odour	clear, colorless liquid product specific
pH-values (in WSH)	undiluted: 1.63 (22 °C)
Storage conditions	room temperature in the dark (area with restricted access)
Date of arrival in the laboratory	13.04.2015

2.2 Component b

Manufacturer	Christeyns France
Name of product	1265 (for neutralisation)
Product diluent recommended by the manufacturer	-
Batch number	PR171-N11
Application	-
Production date	12.03.2015
Expiry date	-
Active compound (s) (100 g)	sodium hydroxide surfactant
Appearance, odour	clear, colorless liquid product specific
pH-values (in WSH)	undiluted: 12.54 (22 °C)
Storage conditions	room temperature in the dark (area with restricted access)
Date of arrival in the laboratory	13.04.2015

3. Materials

3.1 Culture medium and reagents

- Eagle`s Minimum Essential Medium with Earle`s BSS (EMEM, Biozym Scientific GmbH, catalogue no. 880121)
- fetal calf serum (Biochrom AG, article no. S 0115)
- 1.4 % formaldehyde solution (dilution of Roti®-Histofix 4 %, Carl Roth GmbH)
- Aqua bidest. (SG ultrapure water system, type Ultra Clear; serial no. 86996-1)
- PBS (Invitrogen, article no. 18912-014)
- BSA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, article no. CA-2153).

3.2 Virus and cells

The adenovirus type 5 strain adenoid 75 was obtained from PD Dr. A. Heim, Institute of Medical Virology, Hannover Medical School, Hannover, Germany. Before the inactivation assays, the virus had been passaged 3 times in *A549 cells* (human lung epithelial carcinoma cells).

The *A549 cells* (passage 116) originated from Vircell, S.L., Spain, 18320 Santa Fe (now BIOTRIN International GmbH, D-69126 Heidelberg).

The cells were inspected regularly for morphological alterations and for contamination by mycoplasmas. No morphological alterations of cells and no contamination by mycoplasmas could be detected.

3.3 Apparatus, glassware and small items of equipment

- CO_2 incubator, Nunc GmbH & Co. KG, model QWJ 350
- Agitator (Vortex Genie Mixer, type G 560E)
- pH measurement 315i (WTW, article no. 2A10-100)
- Centrifuge (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, type 113)
- Microscope (Olympus, type CK 30)
- Centrifuge 5804 R (Eppendorf AG)
- Water bath (JULABO, Julabo U 3)
- Adjustable and fixed-volume pipettes (Eppendorf AG)
- Polysterol 96-well microtitre plate (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Cell culture flask (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Sealed test tubes (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht).

4. Experimental conditions

Test temperature	20 °C ± 1.0 °C
Concentration of test product	undiluted (80.0 %) and as 40.0 %, 20.0 %, 10.0 % and 0.1 % (demonstration of non-active range) solutions
Appearance of product dilutions	no precipitation
Contact times	1, 5 and 30 minutes
Interfering substance	0.3 g/l bovine serum albumin (clean conditions EN 14476:2013)
Procedure to stop action of disinfectant	immediate dilution
Diluent	water
Stability of product in the mix with virus and interfering substance (80.0 % solution)	no flocculation, no precipitation
Virus strain	adenovirus type 5 strain adenoid 75 (ATCC VR-5)
Date of testing	13.04.2015 – 23.06.2015
End of testing	23.06.2015

5. Methods

5.1 Preparation of test virus suspension

For preparation of test virus suspension according to EN 5.4.1 *A549 cells* were infected with a multiplicity of infection of 0.1 at 37 °C. After cells showed a cytopathic effect, they were subjected to a threefold freeze/thaw procedure followed by a low speed centrifugation in order to sediment cell debris. After aliquotation of the supernatant, test virus suspension was stored at -80 °C.

5.2 Preparation of disinfectant (dilutions)

496.8 g of 1264 were neutralized with 24.5 g of 1265 under stirring. After 15 minutes of stirring, the reconstituted solution was used for the inactivation assays. The pH value was 4.09 at this time point.

The reconstituted solution was evaluated undiluted. Due to the addition of test virus suspension and interfering substance an 80.0 % solution resulted.

Furthermore the product was evaluated as 40.0 %, 20.0 %, 10.0 % and 0.1 % solutions (demonstration of non-active range). These solutions were prepared with water immediately before the inactivation tests.

5.3 Infectivity assay

Infectivity was determined as endpoint titration according to EN 5.5 transferring 0.1 ml of each dilution into eight wells of a microtitre plate, beginning with the highest dilution. This was followed by the addition of 0.1 ml of freshly trypsinized *A549 cells*. This cell suspension was adjusted to reach 10-15 x 10^3 cells per well. Microtitre plates were incubated at 37 °C in a 5 % CO_2-atmosphere. The cytopathic effect was read by using an inverted microscope after ten days. Calculation of the infective dose $TCID_{50}$/ml was calculated with the method of Spearman (2) and Kärber (3) with the following formula:

$$- \log_{10} TCID_{50} = X_0 - 0.5 + \sum r/n$$

meaning

X_0 = $\log_{10}$ of the lowest dilution with 100 % positive reaction

r = number of pos. determinations of lowest dilution step with 100 % positive and all higher positive dilution steps

n = number of determinations for each dilution step.

5.4 Calculation and verification of virucidal activity

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

According to the EN 14476:2013, a disinfectant or a disinfectant solution at a particular concentration is having virus-inactivating efficacy if the titre is reduced at least by four $\log_{10}$ steps within the recommended exposure period. This corresponds to an inactivation of ≥ 99.99 %.

5.5 Inactivation assay

Determination of virucidal activity has been carried out in accordance to EN 5.5. The test product was examined undiluted (80.0 %) and as 40.0 %, 20.0 %, 10.0 % and 0.1 % (demonstration of non-active range) solutions in water at 20 °C according to EN 14476:2013. 1, 5 and 30 minutes were chosen as contact times.

Immediately at the end of a chosen contact time, activity of the disinfectant was stopped by dilution to 10^{-8}.

Titrations of the virus control were performed after the longest exposure time (EN 5.5.7).

Furthermore, a cell control (only addition of medium) was incorporated.

Inactivation tests were carried out in sealed test tubes in a water bath at 20 °C ± 1.0 °C. Aliquots were retained after appropriate exposure times and residual infectivity was determined.

5.6 Determination of cytotoxicity

Determination of cytotoxicity was performed according to EN 5.5.4.1.

5.7 Cell sensitivity to virus

For the control of cell sensitivity to virus two parts by volume of water were mixed with eight parts by volume of the lowest apparently non-cytotoxic dilution of the product. This mixture or PBS as control was added to a volume of double concentrated cell suspension. After 1 h at 37 °C the cells were centrifuged and re-suspended in cell culture medium (EN 5.5.4.2b).

Finally, a comparative titration of the test virus suspension was performed on the pre-treated (disinfectant) and non-pre-treated (PBS) cells as described above.

5.8 Control of efficacy for suppression of disinfectant's activity

Furthermore, a control of efficiency for suppression of disinfectant's activity was included (EN 5.5.5).

5.9 Reference virus inactivation test

As reference for test validation a 0.7 % formaldehyde solution according to EN 5.5.6 was included. 5, 15, 30 and 60 minutes were chosen as contact times. In addition, cytotoxicity of formaldehyde test solution was determined following EN 5.5.6.2 with dilutions up to 10^{-5}.

6. Verification of the methodology

The following criteria as mentioned in EN 5.7 were fulfilled:

a) The titre of the test virus suspension allowed the determination of a ≥ 4 $\log_{10}$ reduction (maximal virus reduction ≥ 4.00 ± 0.00).

b) The test product (80.0 %) showed cytotoxicity in the 1:100 dilutions thus allowing the detection of a 4 $\log_{10}$ reduction of virus titre.

c) The difference of the logarithmic titre of the virus control minus the logarithmic titre of the test virus in the reference inactivation test (see EN 5.7b) was ≥ 3.00 ± 0.25 (between 3.0 – 5.0) after 30 min and ≥ 3.00 ± 0.25 (between 3.5 – 5.5) after 60 min for adenovirus type 5. The value (3.5) after 60 min was not reached because the initial virus titre (7.50) was too low to reach 3.5 with a cytotoxicity of 4.50. The virus titre had to reach 8.00 to demonstrate a log reduction of 3.50 (4.50 + 3.50 = 8.00). Therefore, despite this too low reduction after 60 minutes the test is valid.

d) The comparative titration on pre-treated (disinfectant) and non-pre-treated (PBS) *A549 cells* showed no significant difference (< 1 $\log_{10}$; EN 5.7) of virus titre: 7.50 ± 0.35 (PBS) versus 7.50 ± 0.35 (1:1,000 dilutions of disinfectant as 80.0 % solution) $\log_{10}TCID_{50}$/ml.

e) The control of efficacy for suppression of disinfectant's activity (80.0 %) showed a decrease in virus titre (≤ 4.00 ± 0.46 versus 7.50 ± 0.00 $\log_{10}TCID_{50}$/ml) due to the fact that even the 10.0 % solution showed a reduction of virus titre (RF ≥ 4.00 ± 0.00) after 30 minutes. In these experiments at the end of the defined exposure time the test mixture was immediately diluted and the dilutions transferred to the cell culture. Therefore, despite the insufficient control of efficacy for suppression the assay is valid.

f) One concentration demonstrated a 4 $\log_{10}$ reduction and (at least) one concentration demonstrated a $\log_{10}$ reduction of less than 4.

Since all criteria according EN 5.7 were fulfilled, examination with adenovirus type 5 according to EN 14476:2013 is valid.

7. Results

Results of examination are shown in tables 1 to 9. Tables 1 to 8 demonstrate the raw data, whereas table 9 (a+b) gives a summary of results.

The undiluted test product was able to inactivate adenovirus type 5 after one minute in this quantitative suspension test. The reduction factor was ≥ 4.00 ± 0.00 at this time point (Table 1). This corresponded to an inactivation of ≥ 99.99 %.

The 40.0 % and 20.0 % solutions of the test product were active within 5 minutes of exposure time (Tables 2 and 3). The reduction factor was ≥ 4.00 ± 0.00 for both concentrations.

Tested as 10.0 % solution, the test product was active within 30 minutes of incubation time. The reduction factor was ≥ 4.00 ± 0.00 (Table 4).

Tested as 0.1 % solution, the test product was not active within 5 minutes of exposure time (Table 5).

8. Conclusion

The surface disinfectant 1264+1265 tested undiluted demonstrated effectiveness against adenovirus type 5 after an exposure time of one minute under clean conditions.
Therefore, the surface disinfectant 1264+1265 can be declared as active against adenovirus type 5 as follows:

undiluted 1 minute

Bremen, 23.06.2015

- Dr. Jochen Steinmann -
Scientific Director

INSTITUTE FOR HYGIENE AND MICROBIOLOGY · DR. BRILL + DR. STEINMANN · CERTIFIED

9. Quality control

The Quality Assurance of the results was maintained by performing the determination of the virus-inactivating properties of the disinfectant in accordance with Good Laboratory Practice regulations:

1) Chemicals Act of Germany, Appendix 1, dating of 01.08 1994 (BGBI. I, 1994, page 1703). Appendix revised at 14. 05. 1997 (BGBI. I, 1997, page 1060).
2) OECD Principles of Good Laboratory Practice (revised 1997); OECD Environmental Health and Safety Publications; Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring – Number 1. Environment Directorate, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris 1998.

The plausibility of the results was additionally confirmed by controls incorporated in the inactivation assays.

10. Records to be maintained

All testing data, protocol, protocol modifications, the final report, and correspondence between Dr. Brill + Partner GmbH and the sponsor will be stored in the archives at Dr. Brill + Partner GmbH.

11. Literature

1. EN 14476:2013: Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemicals disinfectants and antiseptics in human medicine test - Test method and requirements (phase 2, step 1)

2. Spearman, C.: The method of `right or wrong cases` (constant stimuli) without Gauss's formulae. Brit J Psychol; 2 1908, 227-242

3. Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch Exp Path Pharmak; 162, 1931, 480-487

Appendix:

Legend to the Tables

Table 1: Raw data for 1264+1265 (80.0 %) tested against adenovirus type 5

Table 2: Raw data for 1264+1265 (40.0 %) tested against adenovirus type 5

Table 3: Raw data for 1264+1265 (20.0 %) tested against adenovirus type 5

Table 4: Raw data for 1264+1265 (10.0 %) tested against adenovirus type 5

Table 5: Raw data for 1264+1265 (0.1 %) tested against adenovirus type 5

Table 6: Raw data for formaldehyde solution (0.7 %) tested against adenovirus type 5

Table 7: Raw data for control of efficacy for suppression of disinfectant activity (80.0 %)

Table 8: Raw data (adenovirus type 5) for cell sensitivity (80.0 %)

Table 9 (a+b): Summary of results with 1264+1265 and adenovirus type 5

Legend to the Figures

Figure 1: Virus-inactivating properties of 1264+1265 (80.0 %)

Figure 2: Virus-inactivating properties of formaldehyde (0.7 %)

Table 1: Raw data for 1264+1265 (80.0 %) tested against adenovirus type 5 at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3948)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	80.0%	clean conditions	1	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			5	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	80.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0220 3234	0300 0000	0000 0000	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4433 4334	0000 0000	0000 0000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 2: Raw data for 1264+1265 (40.0 %) tested against adenovirus type 5 at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3948)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	40.0%	clean conditions	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			5	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	40.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0220 3234	0300 0000	0000 0000	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4433 4334	0000 0000	0000 0000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 3: Raw data for 1264+1265 (20.0 %) tested against adenovirus type 5 at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3948)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	20.0%	clean conditions	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			5	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	20.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0220 3234	0300 0000	0000 0000	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4433 4334	0000 0000	0000 0000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 4: Raw data for 1264+1265 (10.0 %) tested against adenovirus type 5 at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3948)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	10.0%	clean conditions	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
test product cytotoxicity	10.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0220 3234	0300 0000	0000 0000	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4433 4334	0000 0000	0000 0000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 5: Raw data for 1264+1265 (0.1 %) tested against adenovirus type 5 at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3948)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	0.1%	clean conditions	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			5	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	3444 0424	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	0.1%	clean conditions	n.a.	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0220 3234	0300 0000	0000 0000	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4433 4334	0000 0000	0000 0000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 6: Raw data for formaldehyde solution (0.7 %) tested against adenovirus type 5 at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3948)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	3112 3113	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	PBS	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 2044	0000 0040	0000 0000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 7: Raw data for control of efficacy for suppression of disinfectant's activity (80.0 %) (3948)

Product	Interfering substance	dilutions (log_{10})								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	PBS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product	clean conditions	tttt tttt	tttt tttt	0044 0000	0000 0033	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
test product	dirty conditions	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 8: Raw data (adenovirus type 5) for cell sensitivity (80.0 %) (3948)

Product	Dilution	Dilutions (log_{10})								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
PBS	-	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4440 4414	0000 0002	0000 0000	n.d.
test product	1:10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product	1:100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product	1:1,000	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4323 2034	3000 0000	0000 0000	n.d.

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 9a: Summary of results with 1264+1265 and

Product	Con-centration	Interfering substance	Level of cytotoxicity	log_{10} $TCID_{50}$/ml after ....min					> 4 log_{10} reduction after … min
					1	5	1	3	
test product	%	clean conditions	3.50	n.d.	≤3.50±0.00	≤3.50±0.00	n.d.	n.d.	1 (RF ≥ 4.00 00)
test product	.0%	clean conditions	3.50	n.d.	n.d.	≤3.50±0.00	n.d.	n.d.	5
test product	.0%	clean conditions	3.50	n.d.	n.d.	≤3.50±0.00	n.d.	n.d.	
test product	%	clean conditions	3.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	≤3.50±0.00	30
test product	%	clean conditions	1.50	n.d.	n.d.	7.38±0.25	n.d.	n.d.	> 5

n.a. = not applicable n.d.

Table 9b: Summary of results with 1264+1265 and adenovirus type 5

Product	Con-centration	Interfering substance	Level of cytotoxicity	log_{10} $TCID_{50}$/ml after ....min					> 4 log_{10} reduction after … min
				0	5	15	30	60	
formaldehyde	0.7% (w/v)	PBS	4.50	n.d.	6.38±0.41	4.50±0.00	≤4.50±0.00	≤4.50±0.00	≥ 15 (RF ≥ 3.00±0.25)
virus contr.	n.a.	PBS	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.50±0.35	n.a.
virus contr.	n.a.	clean conditions	n.a.	7.38±0.41	n.d.	n.d.	n.d.	7.50±0.00	n.a.
suppression control	80.0%	clean conditions	3.50	n.d.	n.d.	n.d.	≤4.00±0.46	n.d.	n.a.
sens.control PBS	n.a.	clean conditions	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.50±0.35	n.a.
sens. control test product	80.0% → 1:1,000	clean conditions	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.50±0.35	n.a.

n.a. = not applicable n.d. = not done sens. = sensitivity

Figure 1: Virus-inactivating properties of 1264+1265 (80.0 %)

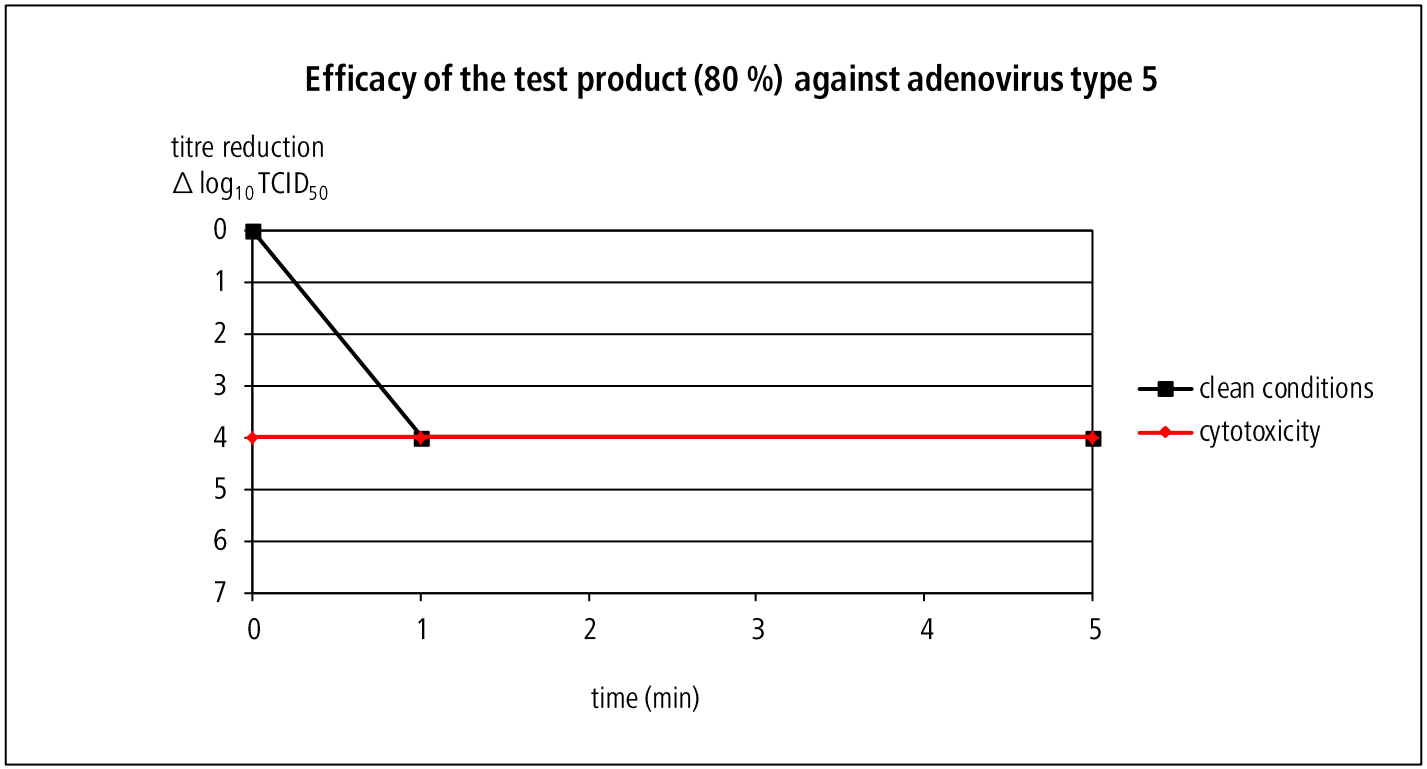
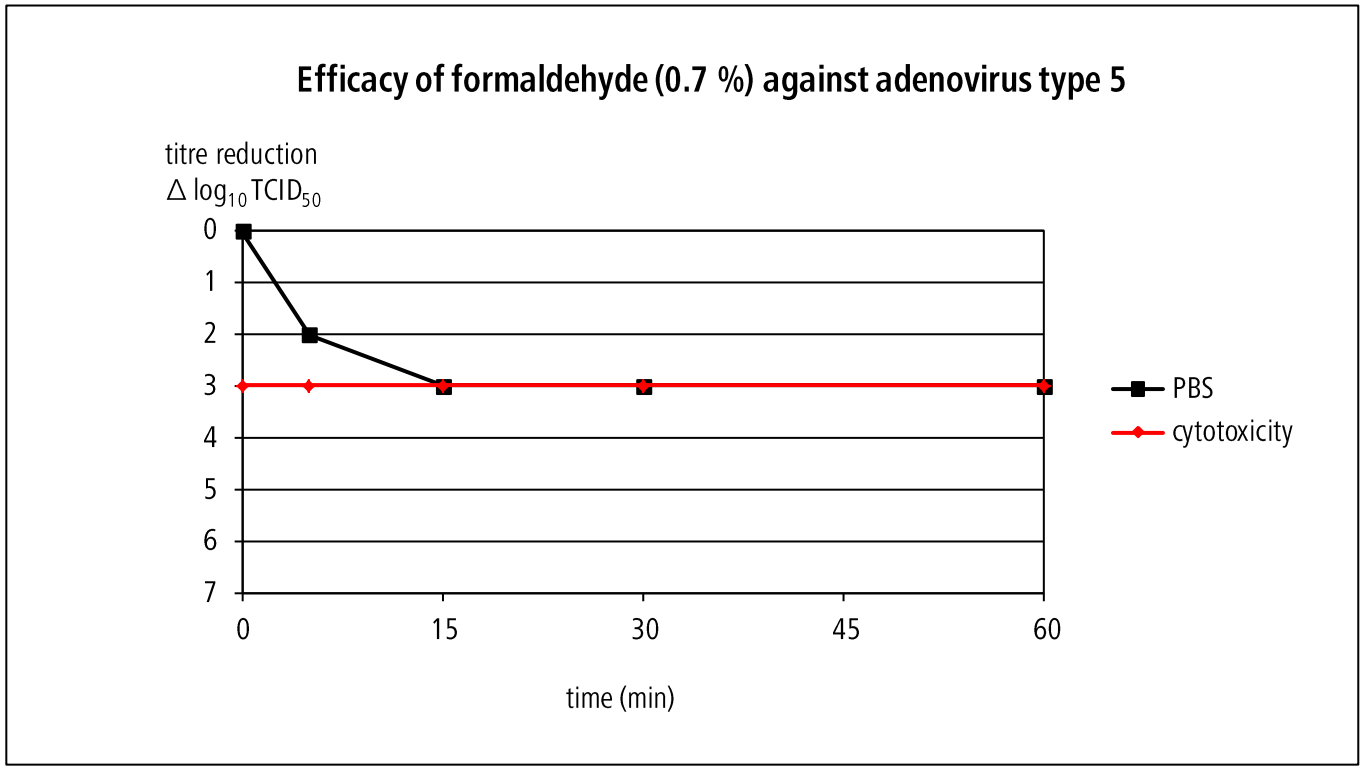


Figure 2: Virus-inactivating properties of formaldehyde (0.7 %)



DR. BRILL + DR. STEINMANN
INSTITUT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE

ilac-MRA DAkkS Deutsche Akkreditierungsstelle D-PL-13412-01-02
Anerkannt durch/Recognized by Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten www.zlg.de
ZLG-AP-306.10.31

TEST REPORT

08.06.2015

Test report C15L0161M

Evaluation of the effectiveness of

1264+1265

Test virus: murine norovirus (as surrogate of human norovirus)

Method: EN 14476:2013 (clean conditions)

quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine

Sponsor:
Christeyns France
Rue de la maladrie 31
FR – 44120 Vertou

Norderoog 2, D - 28259 Bremen
Tel.: +49 421-27819102, Fax: +49 421-2760283
info@brillhygiene.com, http://www.brillhygiene.com

1. Identification of test laboratory

Dr. Brill + Partner GmbH Institute for Hygiene and Microbiology, Norderoog 2, D - 28259 Bremen

2. Identification of sample

2.1 Component a

Manufacturer	Christeyns France
Name of product	1264
Product diluent recommended by the manufacturer	-
Batch number	PR171-23
Application	surface disinfectant
Production date	12.03.2015
Expiry date	-
Active compound (s) (100 g)	acetic acid hydrogen peroxide peracetic acid
Appearance, odour	clear, colorless liquid product specific
pH-values (in WSH)	undiluted: 1.63 (22 °C)
Storage conditions	room temperature in the dark (area with restricted access)
Date of arrival in the laboratory	13.04.2015

2.2 Component b

Manufacturer	Christeyns France
Name of product	1265 (for neutralisation)
Product diluent recommended by the manufacturer	-
Batch number	PR171-N11
Application	-
Production date	12.03.2015
Expiry date	-
Active compound (s) (100 g)	sodium hydroxide surfactant
Appearance, odour	clear, colorless liquid product specific
pH-values (in WSH)	undiluted: 12.54 (22 °C)
Storage conditions	room temperature in the dark (area with restricted access)
Date of arrival in the laboratory	13.04.2015

3. Materials

3.1 Culture medium and reagents

- Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM, Biozym Scientific GmbH, catalogue no. 880006)
- Fetal calf serum (Thermo Fisher, article no. CH30160.02)
- 1.4 % formaldehyde solution
- Aqua bidest. (Fresenius Kabi Deutschland, article no. P2N 1636071)
- PBS (Invitrogen, article no. 18912-014)
- BSA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, article no. CA-2153).

3.2 Virus and cells

Murine norovirus (MNV) was obtained from PD. Dr. E. Schreier, Head of FG15 Molecular Epidemiology of Viral Pathogens at the Robert Koch-Institute (RKI) in Berlin. Prior to inactivation, MNV was passaged three times in *RAW 264.7 cells* (a macrophage-like, Abelson leukemia virus transformed cell line derived from BALB/c mice, ATCC TIB-71).

The cells (passage 36) were inspected regularly for morphological alterations and for contamination by mycoplasmas. No morphological alterations of cells and no contamination by mycoplasmas could be detected.

3.3 Apparatus, glassware and small items of equipment

- CO_2 incubator, Nunc GmbH & Co. KG, model QWJ 350
- Agitator (Vortex Genie Mixer, type G 560E)
- pH measurement 315i (WTW, article no. 2A10-100)
- Centrifuge (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, type 113)
- Microscope (Olympus, type CK 30)
- Centrifuge 5804 R (Eppendorf AG)
- Water bath (JULABO, Julabo U 3)
- Adjustable and fixed-volume pipettes (Eppendorf AG)
- Polysterol 96-well microtitre plate (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Cell culture flask (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Sealed test tubes (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)

4. Experimental conditions

Test temperature	20 °C ± 1.0 °C
Concentration of test product	undiluted (80.0 %) and as 60.0 %, 50.0 %, 40.0 %, 20.0 % and 1.0 % (demonstration of non-active range) solutions
Appearance of product dilutions	no precipitation
Contact times	1 and 5 minutes
Interfering substance	0.3 g/l bovine serum albumin (BSA, clean conditions EN 14476:2013)
Procedure to stop action of disinfectant	immediate dilution
Diluent	water
Stability of product in the mix with virus and interfering substance (80.0 % solution)	minor flocculation, minor precipitation
Virus strain	murine norovirus (Berlin 06 / 06 / DE Isolate S99)
Date of testing	13.04.2015 – 08.06.2015
End of testing	08.06.2015

5. Methods

5.1 Preparation of test virus suspension

To prepare the test virus suspension, *RAW 264.7 cells* that had been cultured with Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 4.5 g/l glucose and 10 % fetal calf serum with low endotoxin were inoculated with MNV (stock virus solution) in a 175 cm^2 cell culture flask. Once a cytopathic effect had been induced (approx. 1-3 days), freezing and thawing was carried out two times. The cell debris was removed by low speed centrifugation and the supernatant was recovered as test viral suspension, aliquoted and stored at -80 °C.

5.2 Preparation of disinfectant (dilutions)

The test product was evaluated undiluted. Due to the addition of test virus suspension and interfering substance an 80.0 % solution resulted.

Furthermore the product was evaluated as 60.0 %, 50.0 %, 40.0 %, 20.0 % and 1.0 % solutions (demonstration of non-active range). These solutions were prepared with water immediately before the inactivation tests.

5.3 Infectivity assay

Infectivity was determined as endpoint titration according to EN 5.5 transferring 0.1 ml of each dilution into eight wells of a microtitre plate to 0.1 ml of freshly trypsinised *RAW 264.7 cells* (10-15 x 10^3 cells per well), beginning with the highest dilution. Microtitre plates were incubated at 37 °C in a 5 % CO_2-atmosphere. The cytopathic effect was read by using an inverted microscope after five days. Calculation of the infective dose $TCID_{50}$/ml was calculated with the method of Spearman (2) and Kärber (3) with the following formula:

$$- \log_{10}TCID_{50} = X_0 - 0.5 + \sum r/n$$

meaning

X_0 = $\log_{10}$ of the lowest dilution with 100 % positive reaction

r = number of pos. determinations of lowest dilution step with 100 % positive and all higher positive dilution steps

n = number of determinations for each dilution step.

5.4 Calculation and verification of virucidal activity

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

According to the EN 14476:2013, a disinfectant or a disinfectant solution at a particular concentration is having virus-inactivating efficacy if the titre is reduced at least by 4 $\log_{10}$ steps within the recommended exposure period. This corresponds to an inactivation of ≥ 99.99 %.

5.5 Inactivation assay

Determination of virucidal activity has been carried out in accordance to EN 5.5. The test product was examined undiluted (80.0 %) and as 60.0 %, 50.0 %, 40.0 %, 20.0 % and 1.0 % (demonstration of non-active range) solutions in water at 20 °C according to EN 14476:2013. 1 and 5 minutes were chosen as contact times.

Immediately at the end of a chosen contact time, activity of the disinfectant was stopped by dilution to 10^{-8}.

.

Titrations of the virus control were performed after the longest exposure time (EN 5.5.7).

Furthermore, a cell control (only addition of medium) was incorporated.

Inactivation tests were carried out in sealed test tubes in a water bath at 20 °C ± 1.0 °C. Aliquots were retained after appropriate exposure times, and residual infectivity was determined.

5.6 Determination of cytotoxicity

Determination of cytotoxicity was performed according to EN 5.5.4.1.

5.7 Cell sensitivity to virus

For the control of cell sensitivity to virus two parts by volume of water were mixed with eight parts by volume of the lowest apparently non-cytotoxic dilution of the product. This mixture or PBS as control was added to a volume of double concentrated cell suspension. After 1 h at 37 °C the cells were centrifuged and re-suspended in cell culture medium (EN 5.5.4.2b).

Finally, a comparative titration of the test virus suspension was performed on the pre-treated (disinfectant) and non-pre-treated (PBS) cells as described above.

5.8 Control of efficacy for suppression of disinfectant's activity

Furthermore, a control of efficiency for suppression of disinfectant's activity was included (EN 5.5.5).

5.9 Reference virus inactivation test

As reference for test validation a 0.7 % formaldehyde solution according to EN 5.5.6 was included. 5, 15, 30 and 60 minutes were chosen as contact times. In addition, cytotoxicity of formaldehyde test solution was determined following EN 5.5.6.2 with dilutions up to 10^{-5}.

6. Verification of the methodology

The following criteria as mentioned in EN 5.7 were fulfilled:

a) The titre of the test virus suspension allowed the determination of a ≥ 4 log_{10} reduction (maximal virus reduction ≥ 4.50 ± 0.37).

b) The test product showed cytotoxicity in the 1:1,000 dilutions (60.0 %) thus allowing the detection of a 4 log_{10} reduction of virus titre.

c) The comparative titration on pre-treated (disinfectant) and non-pre-treated (PBS) *RAW 264.7 cells* showed no significant difference (< 1 log_{10}; EN 5.7) of virus titre: 7.88 ± 0.37 (PBS) versus 7.50 ± 0.35 (1:1,000 dilution of disinfectant as 60.0 % solution) $log_{10}TCID_{50}$/ml.

d) The control of efficacy for suppression of disinfectant's activity (80.0 % solution) showed a decrease (< 0.5 log_{10}; EN 5.5.5.1) in virus titre (≤ 5.13 ± 0.45 versus 8.00 ± 0.52 $log_{10}TCID_{50}$/ml) due to the fact that even the 1.0 % solution showed a reduction of virus titre (RF ≥ 3.38 ± 0.57 after 5 minutes). In these experiments at the end of the defined exposure time the test mixture was immediately diluted and the dilutions transferred to the cell culture. Therefore, despite the insufficient control of efficacy for suppression the assay is valid.

e) One concentration demonstrated a 4 log_{10} reduction and (at least) one concentration demonstrated a log_{10} reduction of less than 4.

Since all criteria according EN 5.7 were fulfilled, examination with MNV according to EN 14476:2013 is valid.

7. Results

Results of examination are shown in tables 1 to 11. Tables 1 to 10 demonstrate the raw data, whereas table 11 (a+b) gives a summary of results.

The undiluted test product (80.0 %) was able to inactivate MNV after one minute in this quantitative suspension test. The reduction factor was ≥ 3.50 ± 0.37 at this time point (Table 1). Due to cytotoxicity, a reduction of 4 log_{10} steps could not be shown.

Tested as 60.0 % solution, the test product was able to inactivate MNV after one minute in this quantitative suspension test. The reduction factor was ≥ 4.25 ± 0.25 at this time point (Table 2). This corresponded to an inactivation of ≥ 99.99 %.

The 50.0 % solution of the test product was also able to inactivate MNV after one minute in this quantitative suspension test. The reduction factor was ≥ 4.13 ± 0.43 at this time point (Table 3).

Tested as 40.0 % solution, the test product was active within 5 minutes of exposure time (Table 4). The reduction factor was ≥ 4.50 ± 0.37 at this time point.

Tested as 20.0 % solution, the test product was also active within 5 minutes of exposure time (Table 6). The reduction factor was ≥ 4.50 ± 0.37 at this time point.

Tested as 1.0 % solution, the test product was not active within 5 minutes of exposure time (Table 7).

8. Conclusion

The surface disinfectant 1264+1265 tested undiluted demonstrated effectiveness against MNV after an exposure time of one minute under clean conditions.
Therefore, the surface disinfectant 1264+1265 can be declared as active against MNV as follows:

undiluted	1 minute

Bremen, 08.06.2015

- Dr. Jochen Steinmann -
Scientific Director

INSTITUTE FOR HYGIENE AND MICROBIOLOGY · DR. BRILL + DR. STEINMANN · CERTIFIED

9. Quality control

The Quality Assurance of the results was maintained by performing the determination of the virus-inactivating properties of the disinfectant in accordance with Good Laboratory Practice regulations:

1) Chemicals Act of Germany, Appendix 1, dating of 01.08 1994 (BGBI. I, 1994, page 1703). Appendix revised at 14. 05. 1997 (BGBI. I, 1997, page 1060).
2) OECD Principles of Good Laboratory Practice (revised 1997); OECD Environmental Health and Safety Publications; Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring – Number 1. Environment Directorate, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris 1998.

The plausibility of the results was additionally confirmed by controls incorporated in the inactivation assays.

10. Records to be maintained

All testing data, protocol, protocol modifications, the final report, and correspondence between Dr. Brill + Partner GmbH and the sponsor will be stored in the archives at Dr. Brill + Partner GmbH.

11. Literature

1. EN 14476:2013: Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemicals disinfectants and antiseptics in human medicine test - Test method and requirements (phase 2, step 1)

2. Spearman, C.: The method of `right or wrong cases` (constant stimuli) without Gauss's formulae. Brit J Psychol; 2 1908, 227-242

3. Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch Exp Path Pharmak; 162, 1931, 480-487

Appendix:

Legend to the Tables

Table 1: Raw data for 1264+1265 (80.0 %) tested against MNV

Table 2: Raw data for 1264+1265 (60.0 %) tested against MNV

Table 3: Raw data for 1264+1265 (50.0 %) tested against MNV

Table 4: Raw data for 1264+1265 (40.0 %) tested against MNV (1st assay)

Table 5: Raw data for 1264+1265 (40.0 %) tested against MNV (2nd assay)

Table 6: Raw data for 1264+1265 (20.0 %) tested against MNV

Table 7: Raw data for 1264+1265 (1.0 %) tested against MNV

Table 8: Raw data for formaldehyde solution (0.7 %) tested against MNV

Table 9: Raw data for control of efficacy for suppression of disinfectant's activity (80.0 %)

Table 10: Raw data (MNV) for cell sensitivity (60.0 %)

Table 11 (a+b): Summary of results with 1264+1265 and MNV

Legend to the Figures

Figure 1: Virus-inactivating properties of 1264+1265 (60.0 %)

Figure 2: Virus-inactivating properties of formaldehyde (0.7 %)

Table 1: Raw data for 1264+1265 (80.0 %) tested against MNV at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3915)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	80.0%	clean conditions	0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			1	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.
			2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			5	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	80.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0004 0000	0000 0040	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 0444	0404 0440	0000 4000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 2: Raw data for 1264+1265 (60.0 %) tested against MNV at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3933)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	60.0%	clean conditions	0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			1	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.
			2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	60.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0404 4444	0004 0000	0000 0000	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 4000	0040 0000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 3: Raw data for 1264+1265 (50.0 %) tested against MNV at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3933)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	50.0%	clean conditions	0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			1	tttt tttt	tttt tttt	4000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.
			2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	50.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0404 4444	0004 0000	0000 0000	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 4000	0040 0000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 4: Raw data for 1264+1265 (40.0 %) tested against MNV at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3915) (1st assay)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	40.0%	clean conditions	0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			5	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	40.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0004 0000	0000 0040	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 0444	0404 0440	0000 4000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 5: Raw data for 1264+1265 (40.0 %) tested against MNV at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3924) (2nd assay)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	40.0%	clean conditions	0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			1	tttt tttt	tttt tttt	4004 4000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.
			2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	40.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4044 4444	4000 0040	0000 0000	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0400	0000 0000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 6: Raw data for 1264+1265 (20.0 %) tested against MNV at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3915)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	20.0%	clean conditions	0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			5	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
test product cytotoxicity	20.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0004 0000	0000 0040	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 0444	0404 0440	0000 4000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 7: Raw data for 1264+1265 (1.0 %) tested against MNV at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3915)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	1.0%	clean conditions	0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			5	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0400	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
test product cytotoxicity	1.0%	clean conditions	n.a.	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0004 0000	0000 0040	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 0444	0404 0440	0000 4000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 8: Raw data for formaldehyde solution (0.7 %) tested against MNV at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3915)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4404 4444	0000 0000	n.d.	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4040 4004	0004 0000	n.d.	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	0000 4000	0000 0000	n.d.	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	4400 4444	0040 4004	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.
formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	PBS	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4440 0000	0000 0000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 9: Raw data for control of efficacy for suppression of disinfectant's activity (80.0 %) (3915)

Product	Interfering substance	dilutions (log_{10})								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	PBS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product	clean conditions	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	4004 4004	0000 0400	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
test product	dirty conditions	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 10: Raw data (MNV) for cell sensitivity (60.0 %) (3933)

Product	Dilution	Dilutions (log_{10})								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
PBS	-	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0004 0440	0000 0000	n.d.
test product	1:10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product	1:100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product	1:1,000	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4440 4444	0004 0000	0000 0000	n.d.

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 11a: Summary of results with 1264+1265 and MNV

Product	Con-centration	Interfering substance	Level of cytotoxicity	log_{10} $TCID_{50}$/ml after ....min					> 4 log_{10} reduction after … min
				0.5	1	2	5	30	
test product	80.0%	clean conditions	4.50	n.d.	≤4.50±0.00	n.d.	≤4.50±0.00	n.d.	≥ 1 (RF ≥ 3.50±0.37)
test product	60.0%	clean conditions	3.50	n.d.	≤3.50±0.00	n.d.	n.d.	n.d.	1 (RF ≥ 4.25±0.25)
test product	50.0%	clean conditions	3.50	n.d.	≤3.63±0.25	n.d.	n.d.	n.d.	1 (RF ≥ 4.13±0.43)
test product	40.0%	clean conditions	3.50	n.d.	n.d.	n.d.	≤3.50±0.00	n.d.	5 (RF ≥ 4.50±0.37)
test product	40.0%	clean conditions	3.50	n.d.	≤3.88±0.37	n.d.	n.d.	n.d.	> 1
test product	20.0%	clean conditions	3.50	n.d.	n.d.	n.d.	≤3.50±0.00	n.d.	5 (RF ≥ 4.50±0.37)
test product	1.0%	clean conditions	1.50	n.d.	n.d.	n.d.	4.63±0.25	n.d.	> 5

n.a. = not applicable n.d. = not done

Table 11b: Summary of results with 1264+1265 and MNV

Product	Con-centration	Interfering substance	Level of cytotoxicity	log_{10} $TCID_{50}$/ml after ....min					> 4 log_{10} reduction after … min
				0	5	15	30	60	
formaldehyde	0.7% (w/v)	PBS	4.50	n.d.	7.38±0.25	7.13±0.45	6.63±0.25	≤5.63±0.49	> 60
virus contr.	n.a.	PBS	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.88±0.37	n.a.
virus contr. 1	n.a.	clean conditions	n.a.	7.75±0.35	n.d.	n.d.	n.d.	8.00±0.52	n.a.
virus contr. 2	n.a.	clean conditions	n.a.	7.63±0.41	n.d.	n.d.	n.d.	7.63±0.25	n.a.
virus contr.	n.a.	clean conditions	n.a.	7.38±0.41	n.d.	n.d.	n.d.	7.75±0.35	n.a.
suppression control	80.0%	clean conditions	4.50	n.d.	n.d.	n.d.	≤5.13±0.45	n.d.	n.a.
sens.control PBS	n.a.	n.a.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.88±0.37	n.a.
sens. control test product	60.0% → 1:1,000	n.a.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.50±0.35	n.a.

n.a. = not applicable n.d. = not done sens. = sensitivity

Figure 1: Virus-inactivating properties of 1264+1265 (60.0 %)

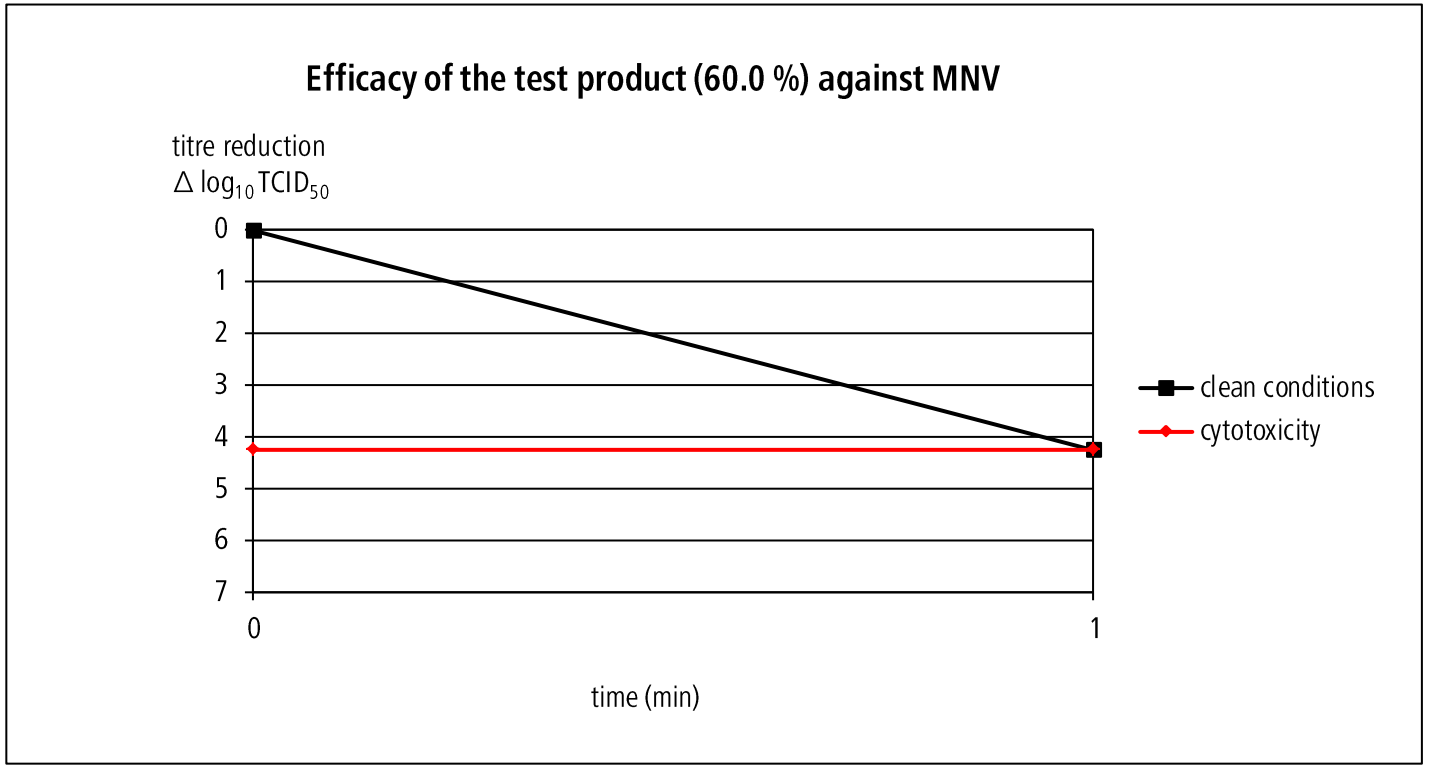
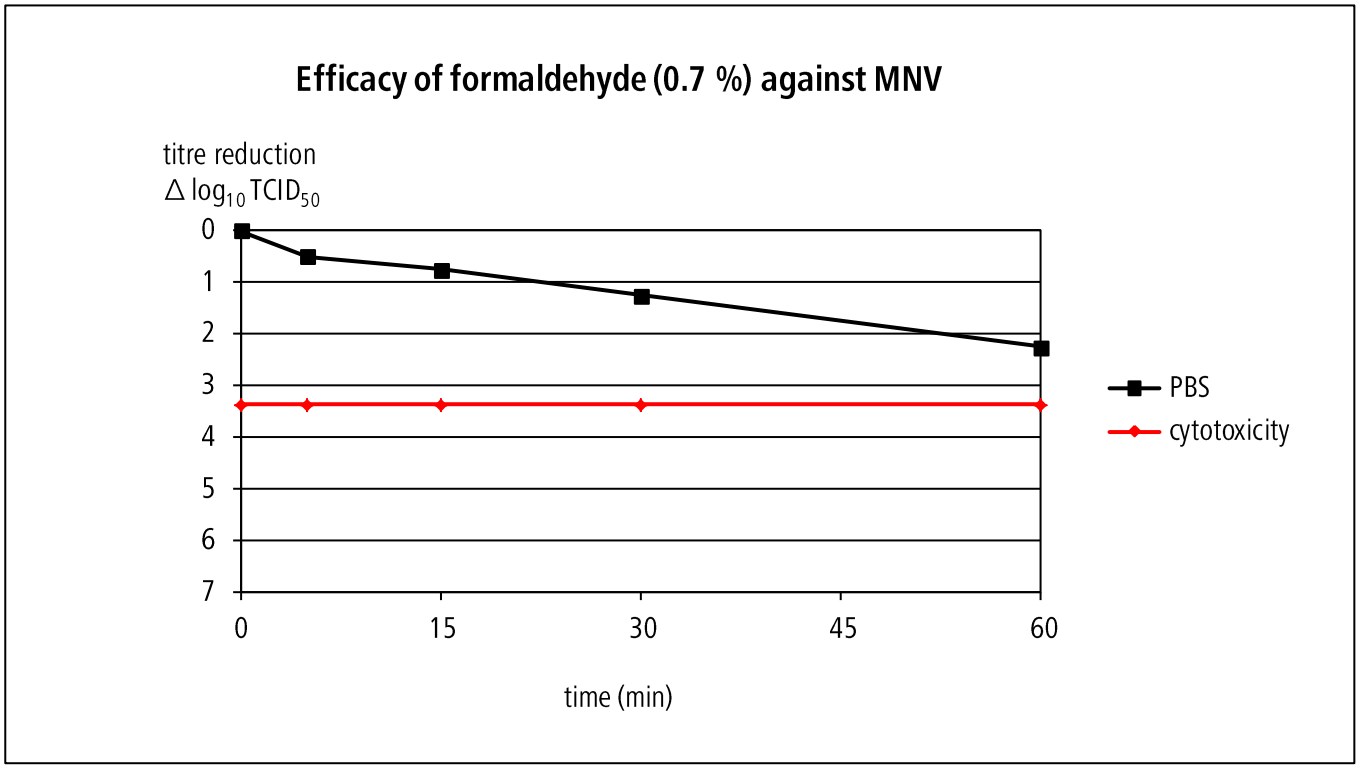


Figure 2: Virus-inactivating properties of formaldehyde (0.7 %)



DR. BRILL + DR. STEINMANN
INSTITUT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE

ilac-MRA DAkkS Deutsche Akkreditierungsstelle D-PL-13412-01-02
Anerkannt durch/Recognized by Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten www.zlg.de
ZLG-AP-306.10.31

TEST REPORT

14.05.2015

Test report C15L0161Po

Evaluation of the effectiveness of

1264+1265

Test virus: poliovirus type 1 strain LSc-2ab

Method: EN 14476:2013

quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine

Sponsor:
Christeyns France
Rue de la maladrie 31
FR – 44120 Vertou

Norderoog 2, D-28259 Bremen
Tel.: +49 421-27819102, Fax: +49 421-2760283
info@brillhygiene.com, http://www.brillhygiene.com

1. Identification of test laboratory

Dr. Brill + Partner GmbH Institute for Hygiene and Microbiology, Norderoog 2, D-28259 Bremen

2. Identification of sample

2.1 Component a

Manufacturer	Christeyns France
Name of product	1264
Product diluent recommended by the manufacturer	-
Batch number	PR171-23
Application	surface disinfectant
Production date	12.03.2015
Expiry date	-
Active compound (s) (100 g)	acetic acid hydrogen peroxide peracetic acid
Appearance, odour	clear, colorless liquid product specific
pH-values (in WSH)	undiluted: 1.63 (22 °C)
Storage conditions	room temperature in the dark (area with restricted access)
Date of arrival in the laboratory	13.04.2015

2.2 Component b

Manufacturer	Christeyns France
Name of product	1265 (for neutralisation)
Product diluent recommended by the manufacturer	-
Batch number	PR171-N11
Application	-
Production date	12.03.2015
Expiry date	-
Active compound (s) (100 g)	sodium hydroxide surfactant
Appearance, odour	clear, colorless liquid product specific
pH-values (in WSH)	undiluted: 12.54 (22 °C)
Storage conditions	room temperature in the dark (area with restricted access)
Date of arrival in the laboratory	13.04.2015

3. Materials

3.1 Culture medium and reagents

- Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM, Biozym Scientific GmbH, catalogue no. 880021)
- fetal calf serum (Biochrom AG, article no. S 0115)
- 1.4 % formaldehyde solution
- Aqua bidest. (Fresenius Kabi Deutschland, article no. P2N 1636071)
- PBS (Invitrogen, article no. 18912-014)
- BSA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, article no. CA-2153).

3.2 Virus and cells

The poliovirus type 1 strain LSc-2ab (Chiron-Behring) was obtained from PD Dr. Olaf Thraenhart, Eurovir, D-14943 Luckenwalde.

BGM cells (*buffalo green monkey* = permanent monkey kidney cell line; supplied by Prof. Dr. Lindl, Institut für angewandte Zellkultur, D-81669 München, Germany) were cultured in a 175 cm^2 flask with Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) and 10 % fetal calf serum (FCS).

Furthermore, cells (passage 43) were inspected regularly for morphological alterations and for contamination by mycoplasmas. No morphological alterations of cells and no contamination by mycoplasmas could be detected**.**

3.3 Apparatus, glassware and small items of equipment

- CO_2 incubator, Nunc GmbH & Co. KG, model QWJ 350
- Agitator (Vortex Genie Mixer, type G 560E)
- pH measurement 315i (WTW, article no. 2A10-100)
- Centrifuge (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, type 113)
- Microscope (Olympus, type CK 30)
- Centrifuge 5804 R (Eppendorf AG)
- Water bath (JULABO, Julabo U 3)
- Adjustable and fixed-volume pipettes (Eppendorf AG)
- Polysterol 96-well microtitre plate (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Cell culture flask (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Sealed test tubes (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht).

4. Experimental conditions

Test temperature	20 °C ± 1.0 °C
Concentration of test product	undiluted (97.0 % and 80.0 %) and as 40.0 %, 20.0 % and 1.0 % (demonstration of non-active range) solutions
Appearance of product dilutions	no precipitation
Contact times	1 und 5 minutes
Interfering substance	0.3 g/l bovine serum albumin (BSA, clean conditions EN 14476:2013)
Procedure to stop action of disinfectant	immediate dilution and large volume plating (LVP)
Diluent	water
Stability of product in the mix with virus and interfering substance (97.0 % and 80.0 % solution)	no flocculation, no precipitation
Virus strain	poliovirus type 1 strain LSc-2ab (Chiron-Behring)
Date of testing	13.04.2015 – 14.05.2015
End of testing	14.05.2015

5. Methods

5.1 Preparation of test virus suspension

For preparation of test virus suspension according to EN 5.4.1 *BGM cells* which had been cultivated in Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) and 10 % fetal calf serum (FCS) were infected with a multiplicity of infection of 0.1 at 37 °C. After cells showed a cytopathic effect, they were subjected to a threefold freeze/thaw procedure followed by a low speed centrifugation (400 g and 15 min) in order to sediment cell debris. After aliquotation of the supernatant, test virus suspension was stored at -80 °C.

5.2 Preparation of disinfectant (dilutions)

496.8 g of 1264 were neutralized with 24.5 g of 1265 under stirring. After 15 minutes of stirring, the reconstituted solution was used for the inactivation assays. The pH value was 4.09 at this time point.

The reconstituted solution was evaluated undiluted. Due to the addition of test virus suspension and interfering substance an 80.0 % solution resulted. Additionally, the test product was examined as 97.0 % solution (0.1 parts virus suspension + 0.2 parts interfering substance (5-fold) + 9.7 parts disinfectant).

Furthermore, the product was evaluated as 40.0 %, 20.0 % and 1.0 % solutions (demonstration of non-active range). These solutions were prepared with water immediately before the inactivation tests.

5.3 Infectivity assay

Infectivity was determined as endpoint titration according to EN 5.5 transferring 0.1 ml of each dilution into eight wells of a microtitre plate to 0.1 ml of freshly trypsinised *BGM cells* (10-15 x 10^3 cells per well), beginning with the highest dilution. Microtitre plates were incubated at 37 °C in a 5 % CO_2-atmosphere. The cytopathic effect was read by using an inverted microscope after seven days. Calculation of the infective dose $TCID_{50}$/ml was calculated with the method of Spearman (2) and Kärber (3) with the following formula:

$$- \log_{10}TCID_{50} = X_0 - 0.5 + \sum r/n$$

meaning

X_0 = $\log_{10}$ of the lowest dilution with 100 % positive reaction

r = number of pos. determinations of lowest dilution step with 100 % positive and all higher positive dilution steps

n = number of determinations for each dilution step.

5.4 Calculation and verification of virucidal activity

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

According to the EN 14476:2013, a disinfectant or a disinfectant solution at a particular concentration is having virus-inactivating efficacy if the titre is reduced at least by four $\log_{10}$ steps within the recommended exposure period. This corresponds to an inactivation of ≥ 99.99 %.

5.5 Inactivation assay

Determination of virucidal activity has been carried out in accordance to EN 5.5. The test product was examined undiluted (97.0 % and 80.0 %) and as 40.0 %, 20.0 % and 1.0 % (demonstration of non-active range) solutions in water at 20 °C according to EN 14476:2013. 1 and 5 minutes were chosen as contact times.

Immediately at the end of a chosen contact time, activity of the disinfectant was stopped by dilution to 10^{-8}.

Titrations of the virus control were performed after the longest exposure time (EN 5.5.7).

Furthermore, a cell control (only addition of medium) was incorporated.

Inactivation tests were carried out in sealed test tubes in a water bath at 20 °C ± 1.0 °C. Aliquots were retained after appropriate exposure times, and residual infectivity was determined.

5.6 Inactivation assay following the large volume plating method (LVP)

Following the large volume plating method (4) the inactivation assays were further diluted 1:5,000 in cell culture medium. The total volume was added (without any further dilution) to the permissive cells. By introducing such a huge dilution it is possible to eliminate cytotoxicity of the test product in order to demonstrate a 4 $\log_{10}$ reduction of virus titre. Calculation of virus titre follows formula of Taylor or Poisson (5, 6). This method is necessary for those products which demonstrate a great cytotoxicity.

12.5 µl of the inactivation assays were added to 62.5 ml DMEM (total dilution of 1:5,000) and then the total volume was distributed in 3 microtitre plates (216 µl / well, 288 wells total). After 7 days of inoculation cultures were observed for cytopathic effects.

The calculation of virus titre without residual virus followed the formula of Poisson:

$$c = \ln p / -V$$

c = number of virus particles

p = the probability to find no virus. The probability to find no virus should not greater than 5 % (p=0.05). By doing so, the number of virus particles can be calculated with a probability of 95 %.

V = test volume (ml)

The titre to be used for calculating the reduction factor (RF) was finally calculated as followed: the determined number of virus particle is first converted with the aid of the dilution factor in the number of particle per ml. Subsequently, the numbers of particles per ml have to be converted in the tissue culture infectious dose per ml ($TCID_{50}$/ml) (1.0 $TCID_{50}$ corresponds to 0.69 infectious virus particles). The common logarithm of this value results in the virus titre ($\log_{10}$ $TCID_{50}$/ml) used for calculating the reduction factor (RF).

In assays with residual virus, formula according to Taylor was used for calculating the virus titre:

$$c/ml = \frac{D}{Vw} \times \left(-\ln \frac{n - n_p}{n}\right)$$

c = number of virus particles

D = dilution

V_W = volume per well

n = number of inoculated wells

n_p = number of virus-positive wells

The logarithmic titre ($log_{10}TCID_{50}$/ml) for calculating the reduction factor using the formula according to Taylor is received as described above.

5.7 Determination of cytotoxicity

Determination of cytotoxicity was performed according to EN 5.5.4.1.

5.8 Cell sensitivity to virus

For the control of cell sensitivity to virus 0.3 parts by volume of water were mixed with 9.7 parts by volume of the lowest apparently non-cytotoxic dilution of the product. This mixture or PBS as control was added to a volume of double concentrated cell suspension. After 1 h at 37 °C the cells were centrifuged and re-suspended in cell culture medium (EN 5.5.4.2b).

Finally, a comparative titration of the test virus suspension was performed on the pre-treated (disinfectant) and non-pre-treated (PBS) cells as described above.

5.9 Control of efficacy for suppression of disinfectant's activity

Furthermore, a control of efficiency for suppression of disinfectant's activity was included (EN 5.5.5).

5.10 Reference virus inactivation test

As reference for test validation a 0.7 % formaldehyde solution according to EN 5.5.6 was included. 5, 15, 30 and 60 minutes were chosen as contact times. In addition, cytotoxicity of formaldehyde test solution was determined following EN 5.5.6.2 with dilutions up to 10^{-5}.

6. Verification of the methodology

The following criteria as mentioned in EN 5.7 were fulfilled:

a) The titre of the test virus suspension allowed the determination of a ≥ 4 $\log_{10}$ reduction (maximal virus reduction ≥ 5.25 ± 0.25).

b) The difference of the logarithmic titre of the virus control minus the logarithmic titre of the test virus in the reference inactivation test (see 6.6.7) was 1.50 ± 0.61 (between 0.5 - 2.5) after 30 min and 2.50 ± 0.44 (between 2.0 - 4.5) after 60 min for poliovirus type 1.

c) The test product (97.0 % and 80.0 %) showed cytotoxicity in the 1:100 dilutions thus allowing the detection of a 4 $\log_{10}$ reduction of virus titre.

d) The comparative titration on pre-treated (disinfectant) and non-pre-treated (PBS) *BGM cells* showed no significant difference (< 1 $\log_{10}$; EN 5.7) of virus titre: 7.75 ± 0.33 (PBS) versus 7.63 ± 0.25 (1:1,000 dilutions of disinfectant) $\log_{10}TCID_{50}$/ml.

e) The control of efficacy for suppression of disinfectant's activity showed no decrease (< 0.5 $\log_{10}$; EN 5.5.5.1) in virus titre (7.13 ± 0.37 versus 6.75 ± 0.44 $\log_{10}TCID_{50}$/ml).

f) One concentration demonstrated a 4 $\log_{10}$ reduction and (at least) one concentration demonstrated a $\log_{10}$ reduction of less than 4.

Since all criteria according EN 5.7 were fulfilled, examination with poliovirus type 1 according to EN 14476:2013 is valid.

7. Results

Results of examination are shown in tables 1 to 13. Tables 1 to 11 demonstrate the raw data, whereas table 12 (a+b) and 13 give a summary of results.

The undiluted test product (97.0 %) was able to inactivate poliovirus type 1 after 5 minutes in this quantitative suspension test (Table 1). The reduction factor was ≥ 5.25 ± 0.25. This corresponded to an inactivation of ≥ 99.99 %.

The large volume plating method (LVP) was introduced with 1 and 5 minutes exposure time. The results are given in tables 9, 10 and 11.

The virus titres in the twofold assay were $\log_{10}TCID_{50}$/ml = 6.75 ± 0.44 and 7.00 ± 0.52. The mean value was 6.88 ± 0.34.

Since all (288 of 288) cell culture units show residual virus after 1 minute in was not possible to calculate the virus titre with the formula of Taylor due to mathematical reasons.

After 5 minutes no residual virus was found in 288 cell culture units. The result according to the formula of Poisson was 2.54 $\log_{10}TCID_{50}$. The reduction factor is therefore 6.88 $\log_{10}TCID_{50}$ minus 2.54 $\log_{10}TCID_{50}$ = 4.34 after 5 minutes of exposure time.

Tested in an 80.0 % assay, the test product was also active against the poliovirus type 1 after 5 minutes exposure time in this quantitative suspension test (Table 2). The reduction factor was ≥ 4.38 ± 0.26.

Tested as 40.0 %, 20.0 % and 1.0 % solutions, the test product was not active within 5 minutes of exposure time (Tables 3, 4 and 5).

8. Conclusion

The surface disinfectant 1264+1265 tested undiluted demonstrated effectiveness against poliovirus type 1 after an exposure time of 5 minutes under clean conditions.

Therefore, the surface disinfectant 1264+1265 can be declared as active against poliovirus type 1 as follows:

undiluted 5 minutes

Bremen, 14.05.2015

- Dr. Jochen Steinmann -
Scientific Director

INSTITUTE FOR HYGIENE AND MICROBIOLOGY · DR. BRILL + DR. STEINMANN · CERTIFIED

9. Quality control

The Quality Assurance of the results was maintained by performing the determination of the virus-inactivating properties of the disinfectant in accordance with Good Laboratory Practice regulations:

1) Chemicals Act of Germany, Appendix 1, dating of 01.08 1994 (BGBI. I, 1994, page 1703). Appendix revised at 14. 05. 1997 (BGBI. I, 1997, page 1060).
2) OECD Principles of Good Laboratory Practice (revised 1997); OECD Environmental Health and Safety Publications; Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring – Number 1. Environment Directorate, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris 1998.

The plausibility of the results was additionally confirmed by controls incorporated in the inactivation assays.

10. Records to be maintained

All testing data, protocol, protocol modifications, the final report, and correspondence between Dr. Brill + Partner GmbH and the sponsor will be stored in the archives at Dr. Brill + Partner GmbH.

11. Literature

1. EN 14476:2013: Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemicals disinfectants and antiseptics in human medicine test - Test method and requirements (phase 2, step 1)

2. Spearman, C.: The method of `right or wrong cases` (constant stimuli) without Gauss's formulae. Brit J Psychol; 2 1908, 227-242

3. Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch Exp Path Pharmak; 162, 1931, 480-487

4. Rabenau HF., Schwebke I., Blümel J., Eggers M., Glebe D., Rapp I., Sauerbrei A., Steinmann E., Steinmann, J., Willkommen H. Wutzler P.: Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin (Fassung vom 1. Dezember 2014). Bundesgesundheitsbl; 58, 2015, 493–504

5. Bekanntmachung über die Zulassung von Arzneimitteln, Anforderungen an Validierungsstudien zum Nachweis der Virussicherheit von Arzneimitteln aus menschlichem Blut oder Plasma vom 20. Dezember 1993/21. Januar 1994. Bundesanzeiger Nr. 84: 4740-4744 bzw. CPMP/BWP/268/95: Note for Guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. http://www.ema.europa.eu

6. Taylor JR.: An Introduction to Error Analysis: The study of Uncertainties in Physical Measurements. 2nd ed. University Science Books, 1997, 327 pp

Appendix:

Legend to the Tables

Table 1: Raw data for 1264+1265 (97.0 %) tested against poliovirus type 1

Table 2: Raw data for 1264+1265 (80.0 %) tested against poliovirus type 1

Table 3: Raw data for 1264+1265 (40.0 %) tested against poliovirus type 1

Table 4: Raw data for 1264+1265 (20.0 %) tested against poliovirus type 1

Table 5: Raw data for 1264+1265 (1.0 %) tested against poliovirus type 1

Table 6: Raw data for formaldehyde solution (0.7 %) tested against poliovirus type 1

Table 7: Raw data for control of efficacy for suppression of disinfectant's activity (97.0 %)

Table 8: Raw data (poliovirus type 1) for cell sensitivity (97.0 %)

Table 9: Determination of virus titre (LVP)

Table 10: Inactivation of poliovirus type 1 by 1264+1265 (97.0 %) (1 min) (LVP)

Table 11: Inactivation of poliovirus type 1 by 1264+1265 (97.0 %) (5 min) (LVP)

Table 12 (a+b): Summary of results (quantitative suspension test) with 1264+1265 and poliovirus type 1

Table 13: Summary of results (LVP) with 1264+1265 and poliovirus type 1

Legend to the Figures

Figure 1: Virus-inactivating properties of 1264+1265 (97.0 %)

Figure 2: Virus-inactivating properties of formaldehyde (0.7 %)

Table 1: Raw data for 1264+1265 (97.0 %) tested against poliovirus type 1 at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3899)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	97.0%	clean conditions	1	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4344	4003 4000	0000 0000	n.d.	n.d.
			5	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	97.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 3444	4000 0000	0000 0004
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4000 0000	0000 0040

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 2: Raw data for 1264+1265 (80.0 %) tested against poliovirus type 1 at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3899)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	80.0%	clean conditions	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			5	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	80.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0044 0004	0000 0000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 3: Raw data for 1264+1265 (40.0 %) tested against poliovirus type 1 at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3899)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	40.0%	clean conditions	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			5	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0444	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	40.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0044 0004	0000 0000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 4: Raw data for 1264+1265 (20.0 %) tested against poliovirus type 1 at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3899)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	20.0%	clean conditions	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			5	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4000	0030 0000	0000 0000	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	20.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0044 0004	0000 0000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 5: Raw data for 1264+1265 (1.0 %) tested against poliovirus type 1 at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3899)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	1.0%	clean conditions	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			5	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4044 4444	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	1.0%	clean conditions	n.a.	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0044 0004	0000 0000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 6: Raw data for formaldehyde solution (0.7 %) tested against poliovirus type 1 at 20 °C (quantal test; 8 wells) (3899)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0404 4444	0040 0040	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0400 0000	0004 0000	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4400 4444	4000 3300	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	0400 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	PBS	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4040 4404	0000 0000	0000 0000

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 7: Raw data for control of efficacy for suppression of disinfectant's activity (97.0 %) (3899)

Product	Interfering substance	dilutions (log_{10})								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	PBS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product	clean conditions	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0440 4044	0000 0000	0000 0000	n.d.
test product	dirty conditions	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
corresponding virus control	clean conditions	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	3044 4444	0400 4400	0000 0000	0000 0000	n.d.

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 8: Raw data (poliovirus type 1) for cell sensitivity (97.0 %) (3899)

Product	Dilution	Dilutions (log_{10})								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
PBS	-	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 4004	0000 0000	n.d.
test product	1:10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product	1:100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product	1:1,000	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0400 0000	0000 0000	n.d.

n.a. = not applicable
n.d. = not done

0 = no virus present; t = cytotoxic
1 to 4 = virus present (degree of CPE in 8 cell culture units) (wells of microtitre plates)

Table 9: Determination of virus titre (LVP) (3899)

Virus titration	Interfering substance	dilutions (log_{10})								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1st assay	clean conditions	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	3044 4444	0400 4400	0000 0000	0000 0000	n.d.
2nd assay	clean conditions	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0444 4444	4400 4040	0400 0000	0000 0000	n.d.

n.a. = not applicable t = cytotoxic 0 = no virus detectable
n.d. = not done 1 to 4 = virus detectable (degree of CPE in 8 wells of a microtitre plate)

Table 10: Inactivation of poliovirus type 1 by 1264+1265 (97.0 %) (LVP) (1 min) (3899)

Interfering substance	Row	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
clean conditions	plate 1/3	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444
	plate 2/3	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444
	plate 3/3	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444

t = cytotoxic 0 = no virus detectable
1 to 4 = virus detectable (degree of CPE in 8 wells of a microtitre plate)

Table 11: Inactivation of poliovirus type 1 by 1264+1265 (97.0 %) (LVP) (5 min) (3899)

Interfering substance	Row	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
clean conditions	plate 1/3	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
	plate 2/3	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
	plate 3/3	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000

t = cytotoxic 0 = no virus detectable
1 to 4 = virus detectable (degree of CPE in 8 wells of a microtitre plate)

Table 12a: Summary of results (quantitative suspension test) with 1264+1265 and poliovirus type 1

Product	Con-centration	Interfering substance	Level of cytotoxicity	log_{10} $TCID_{50}$/ml after ....min					> 4 log_{10} reduction after … min
				1	5	15	30	60	
test product	97.0%	clean conditions	3.50	6.88±0.37	≤3.50±0.00	n.d.	n.d.	n.d.	5 (RF ≥ 5.25±0.25)
test product	80.0%	clean conditions	3.50	n.d.	≤3.50±0.00	n.d.	n.d.	n.d.	5 (RF ≥ 4.38±0.26)
test product	40.0%	clean conditions	2.50	n.d.	7.13±0.37	n.d.	n.d.	n.d.	> 5
test product	20.0%	clean conditions	2.50	n.d.	7.25±0.44	n.d.	n.d.	n.d.	> 5
test product	1.0%	clean conditions	1.50	n.d.	7.38±0.25	n.d.	n.d.	n.d.	> 5

n.a. = not applicable n.d. = not done

Table 12b: Summary of results (quantitative suspension test) with 1264+1265 and poliovirus type 1

Product	Con-centration	Interfering substance	Level of cytotoxicity	log_{10} $TCID_{50}$/ml after ....min					> 4 log_{10} reduction after … min
				0	5	15	30	60	
formaldehyde	0.7% (w/v)	PBS	3.50	n.d.	7.50±0.46	6.75±0.35	6.63±0.49	5.63±0.25	> 60
virus contr.	n.a.	PBS	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8.13±0.37	n.a.
virus contr. (1)	97.0% assay	clean conditions	n.a.	8.75±0.35	n.d.	n.d.	n.d.	8.75±0.35	n.a.
virus contr. (2)	97.0% assay	clean conditions	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.75±0.44	n.a.
virus contr.	80.0% assay	clean conditions	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.88±0.37	n.a.
suppression control	97.0%	clean conditions	3.50	n.d.	n.d.	n.d.	7.13±0.37	n.d.	n.a.
sens.control PBS	n.a.	clean conditions	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.75±0.33	n.a.
sens. control test product	97.0% → 1:1,000	clean conditions	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.63±0.25	n.a.

n.a. = not applicable n.d. = not done sens. = sensitivity

Table 13: Summary of results (LVP) with 1264+1265 and poliovirus type 1

Product	Con-centration	Interfering substance	Level of cytotoxicity	log_{10} $TCID_{50}$/ml after ....min					> 4 log_{10} reduction after ... min
				0	1	5	30	60	
product	97.0%	clean conditions	n.a.	n.d.	n.c.	2.54	n.d.	n.d.	5 (RF = 4.34)
virus control	n.a.	clean conditions	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.75±0.44 7.00±0.52	n.a.
sens. PBS	n.a.	n.a.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.
sens. product	97.0%	n.a.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.

n.a. = not applicable n.d. = not done n.c. = not calculable

Figure 1: Virus-inactivating properties of 1264+1265 (97.0 %)

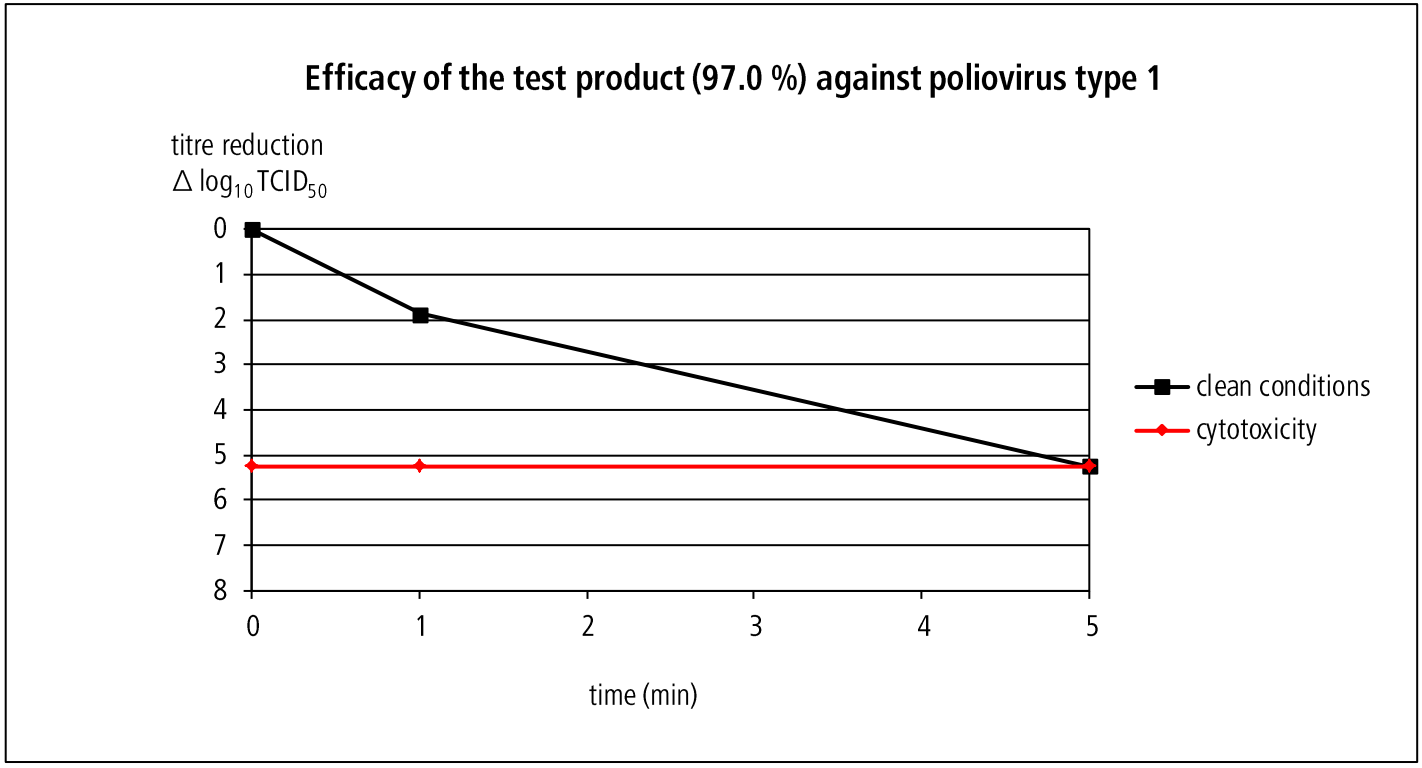
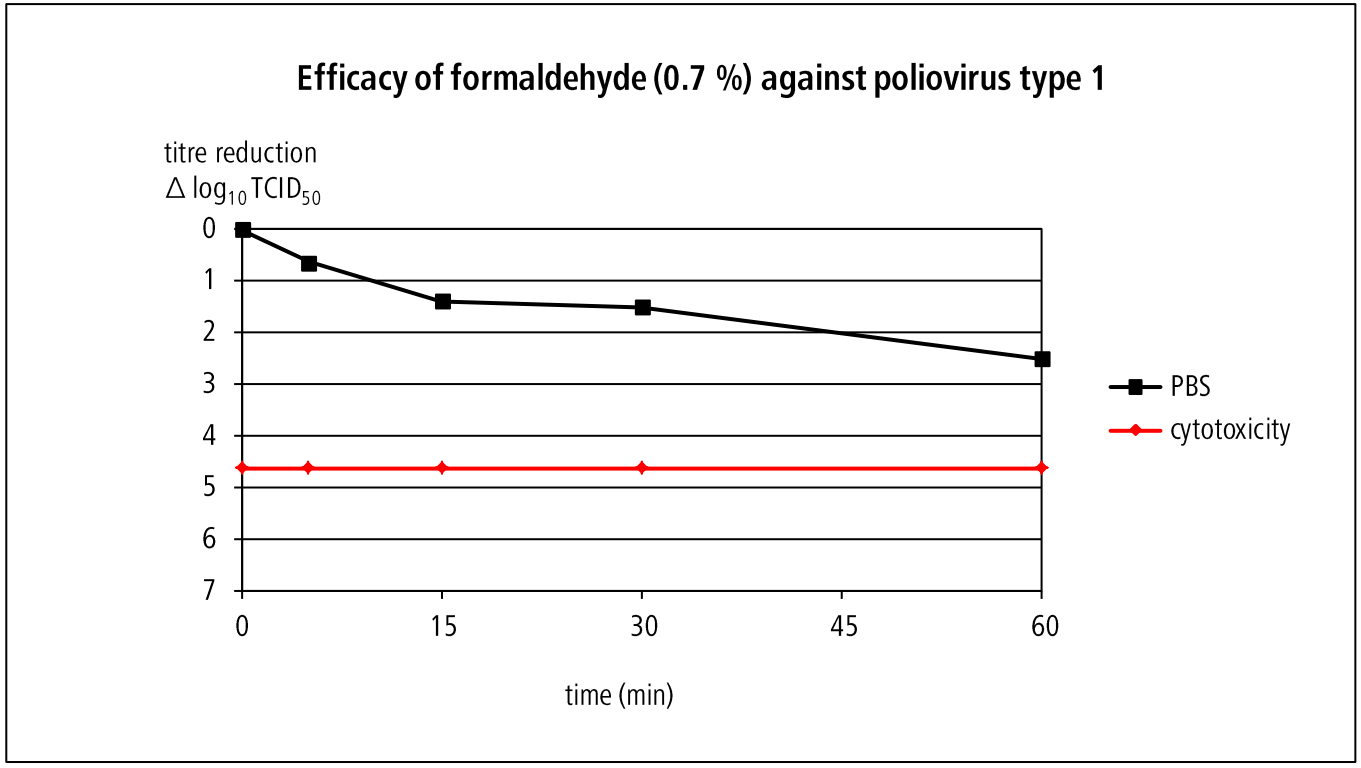


Figure 2: Virus-inactivating properties of formaldehyde (0.7 %)



Chemila, spol. s r.o., Za Dráhou 4386/3, 695 01 Hodonín, tel. +420 518 340 919, chemila@chemila.cz
Chemical and Microbiological Laboratory

Copy No.: 1
Issue No.: 1

Test report No. S68-1/2019

DETERMINATION OF VIRUCIDAL (EN 17111:2018) ACTIVITY OF THE PRODUCT **F178+F179** ON CARRIERS

Sample ID: S68/2019
Sample name: **F178+F179**
Client: Christeyns France S.A., 31, Rue de la Maladrie, 44124 Vertou, France
Producer: Christeyns France S.A., 31, Rue de la Maladrie, 44124 Vertou, France
Sampling point: Christeyns France S.A., 31, Rue de la Maladrie, 44124 Vertou, France

Incoming date:
13.2.2019

Delivery date:
31.10.2019

Hodonín, 31.10.2019

Chemila, spol. s r.o. -2-
Za Dráhou 4386/3, 695 01 Hodonín
tel.: 518 340 919
IČ: 25304518, DIČ: CZ25304518

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

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

Sample ID: S68/2019
Rep No: 55
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyns France S.A., Vertou
Client: Christeyns France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 11.2.2019
Sample delivered: 13.2.2019
Testing date: 12.7. – 6.8.2019
Delivered amount: 5 l, 200 ml
Batch No: 180912/1351-01+180702/1110

Subject of testing:
Determination of virucidal activity of the product.

Identification of the sample:

Name of the product:	**F178+F179**
Batch number:	180912/1351-01+180702/1110
Date of manufacture:	not available
Expiry date:	08/2019
Manufacturer:	Christeyns France S.A., 31, Rue de la Maladrie, 44124 Vertou, France
Incoming date:	13.2.2019
Storage conditions:	5 – 30 °C

Active compounds and concentrations:
F178 – CAS: 64-19-7 Acetic acid <3.5%, CAS: 7722-84-1 Hydrogen peroxide <5%,
CAS 79-21-0 Peracetic acid <0.25%
F179 – CAS: 1310-73-2 Sodium hydroxide, surfactant 5-15%

Experiment conditions:	**Testing of disinfecting efficiency of chemical disinfecting and antiseptic agents on carriers** SOP-M-22-12 (EN 17111:2018)
Period of analysis:	30.7. – 6.8.2019
Test temperature:	20 °C ± 1 °C
Method of titration:	virus titration on monolayers of cells on microtitre plates
Product diluent:	hard water
Appearance of the product:	colourless liquid
Test concentration:	100% (concentrated - Preparation of product test solutions: In a 600 ml beaker, place 496.8 g of F178 and neutralize, under stirring, with 24.5 g of F179 neutralizing. The reconstituted solution should have a pH of 4.0 ± 0.25), 40%, 20%
Contact time:	5 min
Interfering substances:	0.3 g/l BSA (clean conditions)
Reference product:	Glutardialdehyde (50% solution in water) for synthesis, CAS: 111-30-8, Batch No: S7460593, minimum shelf life 31.01.2021, date of delivery: 6.3.2019 (125 ppm, 5 min, clean conditions)
Test virus:	*Adenovirus* type 5, strain Adenoid 75, ATCC VR-5 (2nd passage)
Cell lines:	HeLa cells (11th passage)
Carriers:	frosted glass carriers stated in the standard
The drying time:	35 min
Incubation:	36 °C ± 1 °C, 5 % CO_2, 96 h, and additional period of 72 hours.

Test procedure: Nine volumes of the virus test suspension are mixed with one volume of the interfering substance solution. The test surface is prepared by inoculing 50 µl of the virus suspension plus interfering substance mixture. The surfaces are drying until they are visibly dry. The drying time should not exceed 60 min. The test cariers are used within 60 min, to avoid virus inactivation with time. Immediatelly after drying the inoculated surface is immersed into 10 ml of the product test solution in a cylindrical screw tube and placed in a water bath controlled at the chosen test temperature and for chosen contact time. Water control – the procedure is performed by using 10 ml of hard water or distilled water (RTU). At the end of the contact time the test surface is transferred to a separate container filled with 5 ml of medium and approximately 1 ml of glass beads and placed in a water bath controlled at 20 °C and mixed for 60 s.
Immediately after elution series of ten-fold dilutions of the virus suspension in ice-cold medium are prepared and the dilutions are inoculated on cell culture. The procedure using the other product test solutions is performed at the same time. After incubation, the titre infectivity is calculated according to Spearman-Kärber method.

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

Sample ID: S68/2019
Rep No: 55
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyns France S.A., Vertou
Client: Christeyns France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 11.2.2019
Sample delivered: 13.2.2019
Testing date: 12.7. – 6.8.2019
Delivered amount: 5 l, 200 ml
Batch No: 180912/1351-01+180702/1110

Preparation of the test

1. Determination of the number of the microorganisms CFU/ml in the product
2. Preparation of cell culture
3. Preparation of the test virus suspension
4. Test of viral infectivity
5. Virus titration with interfering substance
6. Cytotoxicity of the product
7. Reference virus inactivation test on carriers
8. Test procedure for virucidal activity of product on carriers

Note:
Virucidal activity – the capability of a product to produce a reduction in the number of infectious virus particles under defined conditions on carriers by at least a 4 lg reduction.

The standard:
EN 17111:2018 Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative carrier test for the evaluation of virucidal activity for instruments used in the medical area – Test method and requirements (phase 2, step 2) October 2018
EN 16777:2018 Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in the medical area – Test method and requirements (Phase 2/Step 2) December 2018

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

1. Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Adenovirus* type 5, strain Adenoid 75, ATCC VR-5

Tab No. 1.1 Table of results of product **F178+F179** on *Adenovirus* type 5, strain Adenoid 75, ATCC VR-5

Product	Concentration	Interfering substances	Level of cytoxicity	- $\log_{10}$ $TCID_{50}$ after 5 min
F178+F179	100%	clean	4.50	4.50
F178+F179	40%	clean	-	4.50
F178+F179	20%	clean	-	4.50
Glutardialdehyde	125 ppm	clean	≤1.50	6.50
			Virus titration, time = 0	
Virus control	-	PBS	-	9.00
Virus control	-	clean	-	9.00
Virus control	-	-	9.50	9.33

Tab No. 1.2 Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Adenovirus* type 5, strain Adenoid 75, ATCC VR-5

Test concentration	Titre of the virus suspension - $\log_{10}$ $TCID_{50}$	Interfering substances	Contact time	- $\log_{10}$ $TCID_{50}$ after test procedure	$\Delta\log_{10}$ $TCID_{50}$
100%	9.00	clean	5 min	4.50	**4.50**
40%	9.00	clean	5 min	4.50	**4.50**
20%	9.00	clean	5 min	4.50	**4.50**

Tab No. 1.3 Testing the efficacy of chemical disinfectant **Glutardialdehyde** on *Adenovirus* type 5, strain Adenoid 75, ATCC VR-5

Test concentration	Titre of the virus suspension - $\log_{10}$ $TCID_{50}$	Interfering substances	Contact time	- $\log_{10}$ $TCID_{50}$ after test procedure	$\Delta\log_{10}$ $TCID_{50}$
125 ppm	9.00	clean	5 min	6.50	**2.50**

Note: $TCID_{50}$- 50% infecting dose of a virus suspension or that dilution of the virus suspension that induce a CPE in 50% of cell culture units

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

Sample ID: S68/2019
Rep No: 55
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyns France S.A., Vertou
Client: Christeyns France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 11.2.2019
Sample delivered: 13.2.2019
Testing date: 12.7. – 6.8.2019
Delivered amount: 5 l, 200 ml
Batch No: 180912/1351-01+180702/1110

2. Evaluation of virucidal activity of the product **F178+F179**

Tab No. 2.1 The efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on test viruses – virucidal activity

Virucidal activity of the product (EN 17111:2018)						
Strain	Test temperature [°C]	Contact time [min]	Product test concentrations [%]	Interfering substances - conditions	$\Delta\log_{10}$ $TCID_{50}$ EN 17111:2018	$\Delta\log_{10}$ $TCID_{50}$
Adenovirus type 5, strain Adenoid 75, ATCC VR-5	20	5	100	clean	≥ 4	**> 4**
Adenovirus type 5, strain Adenoid 75, ATCC VR-5	20	5	40	clean	≥ 4	**> 4**
Adenovirus type 5, strain Adenoid 75, ATCC VR-5	20	5	20	clean	≥ 4	**> 4**

Tab No. 2.2 The efficacy of chemical disinfectant **Glutardialdehyde** on test viruses – virucidal activity

Virucidal activity of the product (EN 16777:2018)						
Strain	Test temperature [°C]	Contact time [min]	Product test concentrations	Interfering substances - conditions	$\Delta\log_{10}$ $TCID_{50}$ EN 16777:2018	$\Delta\log_{10}$ $TCID_{50}$
Adenovirus type 5, strain Adenoid 75, ATCC VR-5	20	5	125 ppm	clean	2 – 3.5	**2.50**

Note: $TCID_{50}$- 50% infecting dose of a virus suspension or that dilution of the virus suspension that induce a CPE in 50% of cell culture units

Prepared by: Bc. Iva Čížová, Lab Technician

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

Sample ID: S68/2019
Rep No: 55
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyns France S.A., Vertou
Client: Christeyns France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 11.2.2019
Sample delivered: 13.2.2019
Testing date: 12.7. – 6.8.2019
Delivered amount: 5 l, 200 ml
Batch No: 180912/1351-01+180702/1110

Experiment conditions:	**Testing of disinfecting efficiency of chemical disinfecting and antiseptic agents on carriers** SOP-M-22-12 (EN 17111:2018)
Period of analysis:	12.7. – 19.7.2019
Test temperature:	20 °C ± 1 °C
Method of titration:	virus titration on monolayers of cells on microtitre plates
Product diluent:	hard water
Appearance of the product:	colourless liquid
Test concentration:	100% (concentrated - Preparation of product test solutions: In a 600 ml beaker, place 496.8 g of F178 and neutralize, under stirring, with 24.5 g of F179 neutralizing. The reconstituted solution should have a pH of 4.0 ± 0.25)*, 40%, 20%
Contact time:	15 min
Interfering substances:	0.3 g/l BSA (clean conditions)
Reference product:	Glutardialdehyde (50% solution in water) for synthesis, CAS: 111-30-8, Batch No: S7460593, minimum shelf life 31.01.2021, date of delivery: 6.3.2019 (1000 ppm, 5 min, clean conditions)
Test virus:	*Murine norovirus (MNV)* strain S99, RVB-651 (3rd passage)
Cell lines:	RAW 264.7 *Murine macrophage* cell line (6th passage)
Carriers:	frosted glass carriers stated in the standard
The drying time:	35 min
Incubation:	36 °C ± 1 °C, 5 % CO_2, 96 h, and additional period of 72 hours.

Test procedure: Nine volumes of the virus test suspension are mixed with one volume of the interfering substance solution. The test surface is prepared by inoculing 50 µl of the virus suspension plus interfering substance mixture. The surfaces are drying until they are visibly dry. The drying time should not exceed 60 min. The test cariers are used within 60 min, to avoid virus inactivation with time. Immediatelly after drying the inoculated surface is immersed into 10 ml of the product test solution in a cylindrical screw tube and placed in a water bath controlled at the chosen test temperature and for chosen contact time. Water control – the procedure is performed by using 10 ml of hard water or distilled water (RTU). At the end of the contact time the test surface is transferred to a separate container filled with 5 ml of medium and approximately 1 ml of glass beads and placed in a water bath controlled at 20 °C and mixed for 60 s.
Immediately after elution series of ten-fold dilutions of the virus suspension in ice-cold medium are prepared and the dilutions are inoculated on cell culture. The procedure using the other product test solutions is performed at the same time. After incubation, the titre infectivity is calculated according to Spearman-Kärber method.
Preparation of the test

1. Determination of the number of the microorganisms CFU/ml in the product
2. Preparation of cell culture
3. Preparation of the test virus suspension
4. Test of viral infectivity
5. Virus titration with interfering substance
6. Cytotoxicity of the product
7. Reference virus inactivation test on carriers
8. Test procedure for virucidal activity of product on carriers

Note:
Virucidal activity – the capability of a product to produce a reduction in the number of infectious virus particles under defined conditions on carriers by at least a 4 lg reduction.
* Product can only be tested at a concentration of 80% or less, as some dilution is always produced by adding the test organisms and interfering substance.

The standard:
EN 17111:2018 Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative carrier test for the evaluation of virucidal activity for instruments used in the medical area – Test method and requirements (phase 2, step 2) October 2018

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

Sample ID: S68/2019
Rep No: 55
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyns France S.A., Vertou
Client: Christeyns France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 11.2.2019
Sample delivered: 13.2.2019
Testing date: 12.7. – 6.8.2019
Delivered amount: 5 l, 200 ml
Batch No: 180912/1351-01+180702/1110

EN 16777:2018 Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in the medical area – Test method and requirements (Phase 2/Step 2) December 2018

3. Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Murine norovirus (MNV)* strain S99, RVB-651
Tab No. 3.1 Table of results of product **F178+F179** on *Murine norovirus (MNV)* strain S99, RVB-651

Product	Concentration	Interfering substances	Level of cytoxicity	- $\log_{10}$ $TCID_{50}$ after 5 min
F178+F179	100%	clean	4.50	4.50
F178+F179	40%	clean	-	4.50
F178+F179	20%	clean	-	4.50
Glutardialdehyde	1000 ppm	clean	2.50	6.50
			Virus titration, time = 0	
Virus control	-	PBS	-	8.50
Virus control	-	clean	-	8.50
Virus control	-	-	9.00	9.00

Tab No. 3.2 Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Murine norovirus (MNV)* strain S99, RVB-651

Test concentration	Titre of the virus suspension - $\log_{10}$ $TCID_{50}$	Interfering substances	Contact time	- $\log_{10}$ $TCID_{50}$ after test procedure	$\Delta\log_{10}$ $TCID_{50}$
100%	8.50	clean	5 min	4.50	**4.00**
40%	8.50	clean	5 min	4.50	**4.00**
20%	8.50	clean	5 min	4.50	**4.00**

Tab No. 3.3 Testing the efficacy of chemical disinfectant **Glutardialdehyde** on *Murine norovirus (MNV)* strain S99, RVB-651

Test concentration	Titre of the virus suspension - $\log_{10}$ $TCID_{50}$	Interfering substances	Contact time	- $\log_{10}$ $TCID_{50}$ after test procedure	$\Delta\log_{10}$ $TCID_{50}$
1000 ppm	8.50	clean	5 min	6.50	**2.00**

4. Evaluation of virucidal activity of the product **F178+F179**
Tab No. 4.1 The efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on test viruses – virucidal activity

Virucidal activity of the product (EN 17111:2018)						
Strain	Test temperature [°C]	Contact time [min]	Product test concentrations [%]	Interfering substances - conditions	$\Delta\log_{10}$ $TCID_{50}$ EN 17111:2018	$\Delta\log_{10}$ $TCID_{50}$
Murine norovirus (MNV) strain S99, RVB-651	20	15	100	clean	≥ 4	**4**
Murine norovirus (MNV) strain S99, RVB-651	20	15	40	clean	≥ 4	**4**
Murine norovirus (MNV) strain S99, RVB-651	20	15	20	clean	≥ 4	**4**

Tab No. 2.2 The efficacy of chemical disinfectant **Glutardialdehyde** on test viruses – virucidal activity

Virucidal activity of the product (EN 16777:2018)						
Strain	Test temperature [°C]	Contact time [min]	Product test concentrations	Interfering substances - conditions	$\Delta\log_{10}$ $TCID_{50}$ EN 16777:2018	$\Delta\log_{10}$ $TCID_{50}$
Murine norovirus (MNV) strain S99, RVB-651	20	5	1000 ppm	clean	1.3 – 3.0	**2.00**

Note: $TCID_{50}$- 50% infecting dose of a virus suspension or that dilution of the virus suspension that induce a CPE in 50% of cell culture units

Prepared by: Bc. Iva Čižová, Lab Technician

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

Sample ID: S68/2019
Rep No: 55
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyns France S.A., Vertou
Client: Christeyns France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 11.2.2019
Sample delivered: 13.2.2019
Testing date: 12.7. – 6.8.2019
Delivered amount: 5 l, 200 ml
Batch No: 180912/1351-01+180702/1110

Interpretation:
Results of tests are in Tabs.
According to EN 17111:2018 the tested product product **F178+F179,** batch No. 180912/1351-01+180702/1110, in the concentration 100%, 40% and 20%, diluted in hard water, and in the contact time 5 min under clean conditions at temperature 20 °C ± 1 °C on carriers (frosted glass carriers) **proved** by the method of virus titration on monolayers of cells on microtitre plates to reduce the number of infectious *Adenovirus* type 5, strain Adenoid 75, ATCC VR-5 particles under defined conditions by at least a 4 lg reduction.

According to EN 17111:2018 the tested product product **F178+F179,** batch No. 180912/1351-01+180702/1110, in the concentration 100%, 40% and 20%, diluted in hard water, and in the contact time 5 min under clean conditions at temperature 20 °C ± 1 °C on carriers (frosted glass carriers) **proved** by the method of virus titration on monolayers of cells on microtitre plates to reduce the number of infectious *Murine norovirus (MNV)* strain S99, RVB-651 particles under defined conditions by at least a 4 lg reduction.

Conclusion:
The product **F178+F179** is capable of reducing the number of infectious *Adenovirus* and *Murine norovirus (MNV)* particles on carriers (frosted glass carriers) under defined conditions (EN 17111:2018 – 100%, 40% and 20%, 5 min, clean, 20 °C) to the declared values, and consequently, can be called virucidal on carriers.

Chemila, spol. s r.o. -2-
Za Dráhou 4386/3, 695 01 Hodonín
tel.: 518 340 919
IČ: 25304518, DIČ: CZ25304518

31.10.2019, Hodonín

.....
Ing. Barbora Stoklásková, Leader of Study

Raw data – product **F178+F179** tested against : *Adenovirus* type 5, strain Adenoid 75, ATCC VR-5

Sample S68/2019, the test report S68-1/2019,

period of analysis: 30.7. – 6.8.2019

EN 17111: *Adenovirus* type 5, strain Adenoid 75, ATCC VR-5 – 2nd passage (LGC Standards Sp. z o.o., PL, 26.6. 2013),
HeLa cells – 11th passage (LGC Standards Sp. z o.o., PL, 22.5. 2019)

Product diluent: hard water
Appearance of the product: colourless liquid
Test concentration: 100% (concentrated - Preparation of product test solutions: In a 600 ml beaker, place 496.8 g of F178 and neutralize, under stirring, with 24.5 g of F179 neutralizing. The reconstituted solution should have a pH of 4.0 ± 0.25), 40%, 20%
Contact time: 5 min
Interfering substances: 0.3 g/l BSA (clean conditions)
Reference product: Glutaraldehyde (50% solution in water) for synthesis, CAS: 111-30-8, Batch No: S7460593, minimum shelf life 31.01.2021, date of delivery: 6.3.2019 (125 ppm, 5 min, clean conditions)
Carriers: frosted glass carriers stated in the standard
The drying time: 35 min

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time min	Dilution (lg)[a]								
				2	3	4	5	6	7	8	9	10
F178+F179	100%	clean	5	444 444	444 444	444 444	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000
F178+F179	40%	clean	5	444 444	444 444	444 444	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000
F178+F179	20%	clean	5	444 444	444 444	222 222	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000
F178+F179 cytotoxicity	100%	clean	n.a.	444 444	444 444	444 444	000 000	000 000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glutardialdehyde	125 ppm	clean	5	444 444	333 444	333 333	222 222	220 220	000 220	000 000	000 000	000 000
Glutardialdehyde **cytotoxicity**	125 ppm	clean	n.a.	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Interference control	non-cytotoxic concentration	n.a.	n.a.	444 444	444 444	444 444	443 333	333 333	222 222	222 222	002 220	000 000
Neutralization	100%	clean	n.a.	444 444	444 444	444 444	443 333	333 333	222 222	222 222	022 200	000 000
Virus control	n.a.	PBS	5	444 444	444 444	444 444	344 443	333 333	222 222	222 222	000 222	000 000
Virus control	n.a.	clean	5	444 444	444 444	444 444	333 344	333 333	222 222	222 222	000 222	000 000
Virus control	n.a.	-	0	444 444	444 444	444 444	333 344	333 333	322 222	222 222	222 222	000 000
			5	444 444	444 444	444 444	333 344	333 333	322 222	222 222	202 222	000 000

a – dilution,
1 to 4 – degree of CPE in 6 cell culture units,
0 – no CPE,
n.a. – not applicable,
n.d. – not done
$TCID_{50}$ - 50% infecting dose of a virus suspension or that dilution of the virus suspension that induce a CPE in 50% of cell culture units

Prepared by: Bc. Iva Čížová, Lab Technician
Controlled by: Ing. Barbora Stoklásková, Leader of Study

Raw data – product **F178+F179** tested against *Murine norovirus (MNV)* strain S99, RVB-651

Sample S68/2019, the test report S68-1/2019,

Period of analysis: 12.7. – 19.7.2019

EN 17111: *Murine norovirus (MNV)* strain S99, RVB-651 – 3rd passage (FLI Germany, 15.12.2010),
RAW 264.7 *Murine macrophage* cell line – 6th passage (LGC Standards Sp. z o.o., PL, 25.1. 2019)

Product diluent:	hard water
Appearance of the product:	colourless liquid
Test concentration:	100% (concentrated - Preparation of product test solutions: In a 600 ml beaker, place 496.8 g of F178 and neutralize, under stirring, with 24.5 g of F179 neutralizing. The reconstituted solution should have a pH of 4.0 ± 0.25), 40%, 20%
Contact time:	5 min
Interfering substances:	0.3 g/l BSA (clean conditions)
Reference product:	Glutaraldehyde (50% solution in water) for synthesis, CAS: 111-30-8, Batch No: S7460593, minimum shelf life 31.01.2021, date of delivery: 6.3.2019 (1000 ppm, 5 min, clean conditions)
Carriers:	frosted glass carriers stated in the standard
The drying time:	35 min

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time min	Dilution (lg)[a]								
				2	3	4	5	6	7	8	9	10
F178+F179	100%	clean	5	444 444	444 444	444 444	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000
F178+F179	40%	clean	5	444 444	444 444	444 444	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000
F178+F179	20%	clean	5	444 444	444 444	222 222	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000	000 000
F178+F179 cytotoxicity	100%	clean	n.a.	444 444	444 444	444 444	000 000	000 000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glutardialdehyde	1000 ppm	clean	5	444 444	444 444	444 444	333 333	222 222	000 000	000 000	000 000	000 000
Glutardialdehyde **cytotoxicity**	1000 ppm	clean	n.a.	444 444	000 000	000 000	000 000	000 000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Interference control	non-cytotoxic concentration	n.a.	n.a.	444 444	444 444	444 444	333 333	333 333	222 222	222 000	022 200	000 000
Neutralization	100%	clean	n.a.	444 444	444 444	444 444	333 333	333 333	222 222	000 222	002 220	000 000
Virus control	n.a.	PBS	5	444 444	444 444	444 444	333 333	333 333	222 222	222 000	022 200	000 000
Virus control	n.a.	clean	5	444 444	444 444	444 444	333 333	333 333	222 222	222 000	200 022	000 000
Virus control	n.a.	-	0	444 444	444 444	444 444	333 333	333 333	222 222	222 222	200 022	000 000
			5	444 444	444 444	444 444	333 333	333 333	222 222	222 222	202 200	000 000

a – dilution,
1 to 4 – degree of CPE in 6 cell culture units,
0 – no CPE,
n.a. – not applicable,
n.d. – not done
$TCID_{50}$ - 50% infecting dose of a virus suspension or that dilution of the virus suspension that induce a CPE in 50% of cell culture units

Prepared by: Bc. Iva Čížová, Lab Technician
Controlled by: Ing. Barbora Stoklásková, Leader of Study

TEST REPORT N. 15/000183637

date of issue 03/06/2015

Customer ID 0067822

Messrs
CHRISTEYNS FRANCE SA
BP 2421
44124 VERTOU CEDEX
Francia

Sample information

Acceptance number 15.024034.0001

Collected by The Courier - on 15/01/2015, Delivered by The Courier on 15/01/2015

Receiving Date 15/01/2015

Place of origin CHRISTEYNS FRANCE SA BP 2421 44124 VERTOU CEDEX Francia

Sample Description PRODUCTS PR1264+1265 pH=4_ATTIVITA' DI RICERCA LABBIO

Sampling information

Sampled by Customer

ANALYTICAL RESULTS

	Value/Uncertain	Unit of measure	LoQ	LoD	Start/end date of analysis	Op. units	Line
ON SAMPLE AS IT IS							1
RESEARCH ANALYSIS Met.: .	view attached report				16/01/2015- -27/05/2015	09	2

Operative units

Unit 09 : Via Fratta Resana PHARMA (TV)

Responsabile prove biologiche	Direttore laboratorio
Dott.ssa Federica Cattapan Ordine nazionale dei biologi Albo professionale n.045961 sez.A	Dott. Sébastien Moulard

- If not otherwise specified, the uncertainty is extended and has been calculated with a recovery factor k=2 corresponding to a probability interval of about 95%. - LoD is the detection limit and identifies a confidence interval of zero with a probabilty interval of about 99%. - LoQ is the limit of quantification."n.d" is not detected and indicates a value inferior to the LoD. "traces (X)" means a value between LoD and LoQ, this value is indicative. "<x" or ">x" indicate inferior or superior to the measurement field of the test. - If not differently specified, the sums are calculated by lower bound criteria (L.B.). - Registration with the number 7 of the Regional List of the laboratories of the Regione Veneto which perform analyses as regards the procedures for the food safety in food industries, as reported in Annex A of DDR n°73 of 16th January 2008 - If not differently specified the quantitative microbiological tests (excluded MPN) are performed on single repetition and two consecutive dilutions in accordance to ISO 7218:2007/Amd1:2013.

Chelab S.r.l, a Mérieux NutriSciences company
Head office: Via Fratta 25 31023 Resana, Italy Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.chelab.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

EVALUATION OF SPORICIDAL ACTIVITY ACCORDING TO UNI EN 14347/2005: BASIC SPORICIDAL ACTIVITY

Chelab S.r.l, a Mérieux NutriSciences company – Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0 423.7177 / Fax + 39 0423.715058
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00. – www.chelab.it

Sponsor:	CHRISTEYNS FRANCE SA BP 2421 44124 VERTOU CEDEX Francia
Contract Laboratory:	CHELAB-SILLIKER SRL
Analysts:	Dr. Francesca Squizzato Dr. Giulio Zilio Dr. Luna Ravasio
Analysis requested:	Quantitative suspension test for the evaluation of basic sporicidal activity according to UNI EN 14347:2005

Chelab S.r.l, a Mérieux NutriSciences company – Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0 423.7177 / Fax + 39 0423.715058
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00. – www.chelab.it

a) Sample Identification:

- Product Name: PRODUCTS PR1264+1265 pH=4
- Laboratory Number: 15.024034.0001

b) Method used: UNI EN 14347:2005 evaluation of basic sporicidal activity

c) Experimental Conditions:

- Test organisms: Spores of *Bacillus subtilis* ATCC 6633
  Bacillus cereus ATCC 12826
- Product test concentrations: 80% 40% 20% (prepared in distilled water)
- Contact time: 5 minutes ± 10 seconds
- Test temperature: 20 °C ± 1°C
- Incubation media: Trypticase Soy Agar
- Incubation conditions: 36°C ± 1°C for 5 days

d) Test Results: see table n° 1-2.

e) Conclusions: According to UNI EN 14347:2005, the test product when used at concentrations:

80% and 40%

has basic sporicidal activity (logR ≥ 4) under the following test conditions:

Contact time 5 minutes ± 10 seconds

Temperature 20 °C ± 1°C

Test organisms: Spores of *Bacillus subtilis* ATCC 6633
Bacillus cereus ATCC 12826

Chelab S.r.l, a Mérieux NutriSciences company – Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0 423.7177 / Fax + 39 0423.715058
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00. – www.chelab.it

Table 1 – test suspension and validation test - test procedure UNI EN 14347:2005

Test organism	Test suspension N1	Test suspension N2	Validation suspension Nv	Neutralizer control B
Bacillus subtilis ATCC 6633	**10^{-6}:** 301-303 **10^{-7}:** 29-32 **N1:** 3.02×10^{8} **lgN1**= 8.48	**10^{0}:** 308-327 **10^{-1}:** 33-31 **N2:** 3.18×10^{2} **lgN2**= 2.5	**10^{-3}:** 61-73 **10^{-4}:** 6-8 **N1:** 6.7×10^{4} **lgNv**= 4.83	**10^{-4}:** 46-63 **10^{-5}:** 2-3 **B:** 5.45×10^{7} **lgB**= 7.74
Bacillus cereus ATCC12826	**10^{-6}:** 310-295 **10^{-7}:** 30-32 **N1:** 3.03×10^{8} **lgN1**= 8.48	**10^{0}:** 315-301 **10^{-1}:** 30-29 **N2:** 3.07×10^{2} **lgN2**= 2.49	**10^{-3}:** 45-41 **10^{-4}:** 4-7 **N1:** 4.3×10^{4} **lgNv**= 4.63	**10^{-4}:** 50-67 **10^{-5}:** 4-7 **B:** 5.85×10^{7} **lgB**= 7.77

Test organism	Validation C 80%		Validation C 40%		Validation C 20%	
	With neutralizer	Without Neutralizer	With neutralizer	Without Neutralizer	With neutralizer	Without Neutralizer
Bacillus subtilis ATCC 6633	**ONT**: >330->330 **10^{-1}**: 40-39 **10^{-1}:** 3-2 **C_N:** 3.95×10^{4} **lg C_N** = 4.60	**ONT**: >330->330 **10^{-1}**: 37-37 **10^{-1}:** 3-5 **C_N:** 3.70×10^{4} **lg C_N** = 4.57	**ONT**: >330->330 **10^{-1}**: 44-43 **10^{-1}:** 3-5 **C_N:** 4.35×10^{4} **lg C_N** = 4.64	**ONT**: >330->330 **10^{-1}**: 38-41 **10^{-1}:** 5-3 **C_N:** 3.95×10^{4} **lg C_N** = 4.60	**ONT**: >330->330 **10^{-1}**: 47-40 **10^{-1}:** 4-6 **C_N:** 4.35×10^{4} **lg C_N** = 4.64	**ONT**: >330->330 **10^{-1}**: 43-39 **10^{-1}:** 3-6 **C_N:** 4.1×10^{4} **lg C_N** = 4.61
Bacillus cereus ATCC 12826	**ONT**: >330->330 **10^{-1}**: 31-40 **10^{-1}:** 3-5 **C_N:** 3.55×10^{4} **lg C_N** = 4.55	**ONT**: >330->330 **10^{-1}**: 32-35 **10^{-1}:** 3-3 **C_N:** 3.35×10^{4} **lg C_N** = 4.52	**ONT**: >330->330 **10^{-1}**: 50-42 **10^{-1}:** 6-4 **C_N:** 4.60×10^{4} **lg C_N** = 4.66	**ONT**: >330->330 **10^{-1}**: 43-49 **10^{-1}:** 5-4 **C_N:** 4.60×10^{4} **lg C_N** = 4.66	**ONT**: >330->330 **10^{-1}**: 50-43 **10^{-1}:** 7-4 **C_N:** 4.65×10^{4} **lg C_N** = 4.68	**ONT**: >330->330 **10^{-1}**: 53-38 **10^{-1}:** 3-5 **C_N:** 4.55×10^{4} **lg C_N** = 4.66

N1 = cfu/mL in test suspension N1
N2 = cfu/mL in test suspension N2
Nv = cfu/mL in validation suspension
B = survivors in neutralizer control
C = survivors in method validation

Chelab S.r.l, a Mérieux NutriSciences company – Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0 423.7177 / Fax + 39 0423.715058
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00. – www.chelab.it

Table 2 – evaluation of basic sporicidal activity - test procedure UNI EN 14347:2005

Test organism	Water control	Procedura del test Concentrazioni % (V/V)		
	Nw	**80%**	**40%**	**20%**
Bacillus subtilis ATCC 6633	**10^{-2} :** >330->330 **10^{-3}**: >330->330 **10^{-4}:** 61-73 **Nw:** 6.70×10^{7} **logNw :** 7.83	**ONT(10^{0}):** 0-0 **10^{-1}:** 0-0 **10^{-2}:** 0-0 **Na**: $<1.5\times 10^{3}$ **logNa**: <3.18 **R >** 4.65 **ACTIVE**	**ONT(10^{0}):** 0-0 **10^{-1}:** 0-0 **10^{-2}:** 0-0 **Na**: $<1.5\times 10^{3}$ **logNa**: <3.18 **R >** 4.65 **ACTIVE**	**ONT(10^{0}):** 0-0 **10^{-1}:** 0-0 **10^{-2}:** 0-0 **Na**: $<1.5\times 10^{3}$ **logNa**: <3.18 **R >** 4.65 **ACTIVE**
Bacillus cereus ATCC 12826	**10^{-2} :** >330->330 **10^{-3}**: >330->330 **10^{-4}:** 56-40 **Nw:** 4.80×10^{7} **logNw :** 7.68	**ONT(10^{0}):** 0-0 **10^{-1}:** 0-0 **10^{-2}:** 0-0 **Na**: $<1.5\times 10^{3}$ **logNa**: <3.18 **R >** 4.50 **ACTIVE**	**ONT(10^{0}):** 0-0 **10^{-1}:** 0-0 **10^{-2}:** 0-0 **Na**: $<1.5\times 10^{3}$ **logNa**: <3.18 **R >** 4.50 **ACTIVE**	**ONT(10^{0}):** 95-104 **10^{-1}:** 10-8 **10^{-2}:** 0-2 **Na**: 9.95×10^{3} **logNa**: 4.00 **R** = 3.68 **NOT ACTIVE**

Na = survivors/ml in test mixture
Nw = cfu/mL in test mixture at the end of contact time and before neutralization

Requirement: R ≥ 4

Table 3 –test with reference substances UNI EN 14347:2005

Test organism	Water control	Reference substances	
	Nw	Glutaraldehyde (GA)	Peracetic acid (PA)
Bacillus subtilis ATCC 6633	**10^{-2} :** >330->330 **10^{-3}**: >330->330 **10^{-4}:** 61-73 **Nw:** 6.70×10^7 **logNw :** 7.83	**ONT(10^0):** >330->330 **10^{-1}:** >330->330 **10^{-2}:** >330->330 **10^{-3}:** 225-241 **Na**: 2.33×10^7 **logNa**: 7.37 **R =** 0.46	**ONT(10^0):** >330->330 **10^{-1}:** >330->330 **10^{-2}:** 48-55 **10^{-3}:** 6-4 **Na**: 5.15×10^5 **logNa**: 5.71 **R =** 2.12
Bacillus cereus ATCC 12826	**10^{-2} :** >330->330 **10^{-3}**: >330->330 **10^{-4}:** 56-40 **Nw:** 4.80×10^7 **logNw :** 7.68	**ONT(10^0):** >330->330 **10^{-1}:** 77-67 **10^{-2}:** 10-6 **10^{-3}:** 1-1 **Na**: 7.2×10^4 **logNa**: 4.86 **R =** 2.82	**ONT(10^0):** >330->330 **10^{-1}:** >330->330 **10^{-2}:** 101-113 **10^{-3}:** 8-12 **Na**: 1.07×10^6 **logNa**: 6.03 **R =** 1.65

GA-standard Exposure time 30 minutes:
B. cereus (1% GA): 3.45 ± 0.7
B. subtilis (3% GA): 1.55 ± 1.15

PA-standard Exposure time 15 minutes:
B. cereus (0.1% PA): 1.25 ± 0.5
B. subtilis (0.05% PA): 2.4 ± 0.4

Chelab S.r.l, a Mérieux NutriSciences company – Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0 423.7177 / Fax + 39 0423.715058
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00. – www.chelab.it

Chemila, spol. s r.o., Za Dráhou 4386/3, Hodonín 69501, Phone +420518340919, chemila@chemila.cz
Chemical and Microbiological Laboratory, Testing Laboratory No. 1273 certified by Czech Accreditation Institute according to ČSN EN ISO/IEC 17025:2005.

Copy No.: 1
Issue No.: 1

Test report No. S266-1/2018

DETERMINATION OF SPORICIDAL (EN 13704:2018) ACTIVITY OF THE PRODUCT **F178+F179**

Sample ID: S266/2018
Sample name: **F178+F179**
Client: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, 44124 Vertou, France
Producer: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, 44124 Vertou, France
Sampling point: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, 44124 Vertou, France

Incoming date:
10.10.2018

Delivery date:
14.2.2019

Hodonín, 14.2.2019

TESTING LABORATORY CERTIFIED BY CZECH ACCREDITATION INSTITUTE
-2-
Chemila, spol. s.r.o.
Za Dráhou 4386/3
695 01 Hodonín
CZ
č. 1273

Ing. Jana Šlitrová, Head of Laboratory

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

Sample ID: S266/2018
Rep No: 159
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyn France S.A., Vertou
Client: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 8.10.2018
Sample delivered: 10.10.2018
Testing date: 4.12. – 9.12.2018
Delivered amount: 4800 ml, 200 ml
Batch No: 180706/0817-01, 180301/1742

Subject of testing:
Determination of sporicidal activity of the product.

Identification of the sample:

Name of the product:	**F178+F179**
Batch number:	180706/0817-01 and 180301/1742
Date of manufacture:	6.7.2018 and 1.3.2018
Expiry date:	2019-06
Manufacturer:	Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, 44124 Vertou, France
Incoming date:	10.10.2018
Storage conditions:	5 – 30 °C

Active compounds and concentrations:
F178 – CAS: 64-19-7 Acetic acid <3.5%, CAS: 7722-84-1 Hydrogen peroxide <5%, CAS 79-21-0 Peracetic acid <0.25%
F179 – CAS: 1310-73-2 Sodium hydroxide, surfactant 5-15%

Experimental conditions:	**Testing of disinfecting efficiency of chemical disinfecting and antiseptic agents by suspension method** SOP-M-19-00 (EN 13704:2018)
Period of analysis:	4.12. – 7.12.2018, 6.12. – 9.12.2018 (*Cl. d.*)
Test temperature:	20 °C ± 1 °C
Test method:	membrane filtration method
Filtration diluent:	rinsing liquid
Product diluent:	distilled water
Appearance of the product:	colourless liquid
Test concentration:	100% (concentrated)*
Contact time:	5 min
Interfering substances:	0.3 g/l BSA (clean conditions)
Test organisms:	*Clostridium sporogenes* DSM 1664 (ATCC 19404) *Clostridium perfringens* CCM 4435 (ATCC 13124)** *Clostridium difficile* DSM 1296 (ATCC 9689) **
Incubation conditions:	30 °C ± 1 °C, minimum 3 and maximum 7 days

Test procedure:
1. Preparation of the test suspension
2. Preparation of product test solutions (In a 600 ml beaker, place 496.8 g of F178 and neutralize, under stirring, with 24.5 g of F179 neutralizing. The reconstituted solution should have a pH of 4.0 ± 0.25)
3. Quantitative suspension test
4. Incubation and calculation
5. Expression and interpretation of the results

Note:
Sporicidal activity – the capability of a product to produce a reduction in the number of bacterial spores belonging to reference strain of *Bacillus subtilis* under defined conditions by at least a 3 lg reduction (10^3).
* Product can only be tested at a concentration of 97% (RTU product) or less, as some dilution is always produced by adding the test organisms and interfering substance.
** The test strain was used according to client's request.

The standard:
EN 13704:2018 Chemical disinfectants – Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements (phase 2, step 1) July 2018

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

Sample ID: S266/2018
Rep No: 159
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyn France S.A., Vertou
Client: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 8.10.2018
Sample delivered: 10.10.2018
Testing date: 4.12. – 9.12.2018
Delivered amount: 4800 ml, 200 ml
Batch No: 180706/0817-01, 180301/1742

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

1. Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Clostridium sporogenes* DSM 1664 (ATCC 19404)

Tab No. 1.1 Verification of methodology, clean conditions

Validation of suspension (N_{v0})			Validation of selected experimental conditions (A)			Membrane filtration control (B)			Method validation (C) Product conc.: 100%*		
V_{c1}	30	$\Phi_{Nv} = 32$	V_{c1}	25	$\Phi_A = 30.5$	V_{c1}	36	$\Phi_B = 29$	V_{c1}	26	$\Phi_C = 28$
V_{c2}	34		V_{c2}	36		V_{c2}	22		V_{c2}	30	
$30 \leq \Phi_{Nv0} \leq 160$			$\Phi_A \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$			$\Phi_B \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$			$\Phi_C \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$		
x	yes	no	x	yes	no	x	yes	no	x	yes	no

Tab No. 1.2 Test suspension

Test suspension N $\Phi = 34 \times 10^6 = \lg 7.53$ $7.17 \leq \lg N \leq 7.70$	N	V_{c1}	V_{c1}	Test suspension N_0 $\lg N_0 = \lg N/100 = \lg 5.53$ $5.17 \leq \lg N_0 \leq 5.70$
	10^{-5}	>165	>165	
	10^{-6}	33	35	
				x yes / no

Tab No. 1.3 Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Clostridium sporogenes* DSM 1664 (ATCC 19404)

Test concentration (%) / contact time (min) / conditions	Dilution after test procedure	V_{c1}	V_{c2}	$\lg N_a = \lg (\Phi_a \times 10)$	**lg R ($\lg N_0 = 5.53$)**
100*/5/clean	10^0	<14	<14	< 2.15	**≥ 3.38**

2. Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Clostridium perfringens* CCM 4435 (ATCC 13124)**

Tab No. 2.1 Verification of methodology, clean conditions

Validation of suspension (N_{v0})			Validation of selected experimental conditions (A)			Membrane filtration control (B)			Method validation (C) Product conc.: 100%*		
V_{c1}	41	$\Phi_{Nv} = 39$	V_{c1}	35	$\Phi_A = 35$	V_{c1}	29	$\Phi_B = 32.5$	V_{c1}	24	$\Phi_C = 30.5$
V_{c2}	37		V_{c2}	35		V_{c2}	36		V_{c2}	37	
$30 \leq \Phi_{Nv0} \leq 160$			$\Phi_A \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$			$\Phi_B \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$			$\Phi_C \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$		
x	yes	no	x	yes	no	x	yes	no	x	yes	no

Tab No. 2.2 Test suspension

Test suspension N $\Phi = 36.5 \times 10^6 = \lg 7.56$ $7.17 \leq \lg N \leq 7.70$	N	V_{c1}	V_{c1}	Test suspension N_0 $\lg N_0 = \lg N/100 = \lg 5.56$ $5.17 \leq \lg N_0 \leq 5.70$
	10^{-5}	>165	>165	
	10^{-6}	42	31	
				x yes / no

Tab No. 2.3 Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Clostridium perfringens* CCM 4435 (ATCC 13124)**

Test concentration (%) / contact time (min) / conditions	Dilution after test procedure	V_{c1}	V_{c2}	$\lg N_a = \lg (\Phi_a \times 10)$	**lg R ($\lg N_0 = 5.56$)**
100*/5/clean	10^0	<14	<14	< 2.15	**≥ 3.41**

Note: V_c = value is the number of cfu per ml, Φ = average V_{c1} a V_{c2} (1. + 2. duplicate V_c values), N = the number of cfu/ml of the spore test suspension, N_0 = the number of cfu/ml of the bacterial test suspension at the beginning of the contact time = 0, N_a = the number of survivors per ml in the test mixture at the end of the contact time, N_{v0} = the number of cfu/ml of the spore validation test suspension, A,B,C = the number of surviving spores per ml in control tests (A – experimental conditions control, B – membrane filtration validation, C – method validation), lg R = lg N_0- lg N_a = the reduction in viability

* Product can only be tested at a concentration of 97% (RTU product) or less, as some dilution is always produced by adding the test organisms and interfering substance.

** The test strain was used according to client's request.

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

Sample ID: S266/2018
Rep No: 159
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyn France S.A., Vertou
Client: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 8.10.2018
Sample delivered: 10.10.2018
Testing date: 4.12. – 9.12.2018
Delivered amount: 4800 ml, 200 ml
Batch No: 180706/0817-01, 180301/1742

3. Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Clostridium difficile* DSM 1296 (ATCC 9689) **

Tab No. 3.1 Verification of methodology, clean conditions

Validation of suspension (N_{v0})			Validation of selected experimental conditions (A)			Membrane filtration control (B)			Method validation (C) Product conc.: 100%*		
V_{c1}	38	$\Phi_{Nv} = 35$	V_{c1}	29	$\Phi_A = 28$	V_{c1}	22	$\Phi_B = 27.5$	V_{c1}	31	$\Phi_C = 28.5$
V_{c2}	32		V_{c2}	27		V_{c2}	33		V_{c2}	26	
$30 \leq \Phi_{Nv0} \leq 160$			$\Phi_A \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$			$\Phi_B \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$			$\Phi_C \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$		
x	yes	no	x	yes	no	x	yes	no	x	yes	no

Tab No. 3.2 Test suspension

Test suspension N $\Phi = 155 \times 10^5 = \lg 7.19$ $7.17 \leq \lg N \leq 7.70$	N	V_{c1}	V_{c1}	Test suspension N_0 $\lg N_0 = \lg N/100 = \lg 5.19$ $5.17 \leq \lg N_0 \leq 5.70$			
	10^{-5}	144	164				
	10^{-6}	15	17				
				x	yes		No

Tab No. 3.3 Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Clostridium difficile* DSM 1296 (ATCC 9689) **

Test concentration (%) / contact time (min) / conditions	Dilution after test procedure	V_{c1}	V_{c2}	$\lg N_a = \lg (\Phi_a \times 10)$	**lg R ($\lg N_0 = 5.19$)**
100*/5/clean	10^0	<14	<14	< 2.15	**≥ 3.04**

4. Evaluation of sporicidal activity of the product **F178+F179**

Tab No. 4.1 The efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on test strains – sporicidal activity

Sporicidal activity of the product (EN 13704:2018)						
Strain	Test temperature [°C]	Contact time [min]	Product test concentrations [%]*	Interfering substances - conditions	lg R EN 13704:2018	**lg R**
Clostridium sporogenes DSM 1664 (ATCC 19404)	20	5	100	clean	≥ 3	**> 3**
Clostridium perfringens CCM 4435 (ATCC 13124)**	20	5	100	clean	≥ 3	**> 3**
Clostridium difficile DSM 1296 (ATCC 9689) **	20	5	100	clean	≥ 3	**> 3**

Note: V_c = value is the number of cfu per ml, Φ = average V_{c1} a V_{c2} (1. + 2. duplicate V_c values), N = the number of cfu/ml of the spore test suspension, N_0 = the number of cfu/ml of the bacterial test suspension at the beginning of the contact time = 0, N_a = the number of survivors per ml in the test mixture at the end of the contact time, N_{v0} = the number of cfu/ml of the spore validation test suspension, A,B,C = the number of surviving spores per ml in control tests (A – experimental conditions control, B – membrane filtration validation, C – method validation), lg R = $\lg N_0 - \lg N_a$ = the reduction in viability

* Product can only be tested at a concentration of 97% (RTU product) or less, as some dilution is always produced by adding the test organisms and interfering substance.

** The test strain was used according to client's request.

Prepared by: Ing. Eva Kremlová, Lab Technician

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

Sample ID: S266/2018
Rep No: 159
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyn France S.A., Vertou
Client: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 8.10.2018
Sample delivered: 10.10.2018
Testing date: 4.12. – 9.12.2018
Delivered amount: 4800 ml, 200 ml
Batch No: 180706/0817-01, 180301/1742

Experimental conditions:	**Testing of disinfecting efficiency of chemical disinfecting and antiseptic agents by suspension method** SOP-M-19-00 (EN 13704:2018)
Period of analysis:	4.12. – 7.12.2018, 6.12. – 9.12.2018 (*Cl. d.*)
Test temperature:	20 °C ± 1 °C
Test method:	membrane filtration method
Filtration diluent:	rinsing liquid
Product diluent:	distilled water
Appearance of the product:	colourless liquid
Test concentration:	100% (concentrated)*, 40%, 20%
Contact time:	5 min
Interfering substances:	0.3 g/l BSA (clean conditions)
Test organisms:	*Clostridium sporogenes* DSM 1664 (ATCC 19404) *Clostridium perfringens* CCM 4435 (ATCC 13124)** *Clostridium difficile* DSM 1296 (ATCC 9689) **
Incubation conditions:	30 °C ± 1 °C, minimum 3 and maximum 7 days

Test procedure:

1. Preparation of the test suspension
2. Preparation of product test solutions (In a 600 ml beaker, place 496.8 g of F178 and neutralize, under stirring, with 24.5 g of F179 neutralizing. The reconstituted solution should have a pH of 4.0 ± 0.25)
3. Quantitative suspension test
4. Incubation and calculation
5. Expression and interpretation of the results

Note:
Sporicidal activity – the capability of a product to produce a reduction in the number of bacterial spores belonging to reference strain of *Bacillus subtilis* under defined conditions by at least a 3 lg reduction (10^3).
* Product can only be tested at a concentration of 80% or less, as some dilution is always produced by adding the test organisms and interfering substance.
** The test strain was used according to client's request.

The standard:
EN 13704:2018 Chemical disinfectants – Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements (phase 2, step 1) July 2018

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

Sample ID: S266/2018
Rep No: 159
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyn France S.A., Vertou
Client: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 8.10.2018
Sample delivered: 10.10.2018
Testing date: 4.12. – 9.12.2018
Delivered amount: 4800 ml, 200 ml
Batch No: 180706/0817-01, 180301/1742

5. Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Clostridium sporogenes* DSM 1664 (ATCC 19404)

Tab No. 5.1 Verification of methodology, clean conditions

Validation of suspension (N_{v0})			Validation of selected experimental conditions (A)			Membrane filtration control (B)			Method validation (C) Product conc.: 100%*		
V_{c1}	36	$\Phi_{Nv} = 33.5$	V_{c1}	29	$\Phi_A = 26$	V_{c1}	33	$\Phi_B = 33$	V_{c1}	29	$\Phi_C = 29.5$
V_{c2}	31		V_{c2}	23		V_{c2}	33		V_{c2}	30	
$30 \leq \Phi_{Nv0} \leq 160$			$\Phi_A \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$			$\Phi_B \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$			$\Phi_C \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$		
x	yes	no	x	yes	no	x	yes	no	x	yes	no

Tab No. 5.2 Test suspension

Test suspension N $\Phi = 34.5 \times 10^5 = \lg 6.54$ $6.17 \leq \lg N \leq 6.70$	N	V_{c1}	V_{c1}	Test suspension N_0 $\lg N_0 = \lg N/10 = \lg 5.54$ $5.17 \leq \lg N_0 \leq 5.70$			
	10^{-4}	>165	>165				
	10^{-5}	33	36				
				x	yes		No

Tab No. 5.3 Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Clostridium sporogenes* DSM 1664 (ATCC 19404)

Test concentration (%) / contact time (min) / conditions	Dilution after test procedure	V_{c1}	V_{c2}	$\lg N_a = \lg (\Phi_a \times 10)$	**lg R ($\lg N_0 = 5.54$)**
100*/5/clean	10^0	<14	<14	< 2.15	**≥ 3.39**
40/5/clean	10^0	<14	<14	< 2.15	**≥ 3.39**
20/5/clean	10^0	14	15	2.16	**3.38**

6. Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Clostridium perfringens* CCM 4435 (ATCC 13124)**

Tab No. 6.1 Verification of methodology, clean conditions

Validation of suspension (N_{v0})			Validation of selected experimental conditions (A)			Membrane filtration control (B)			Method validation (C) Product conc.: 100%*		
V_{c1}	37	$\Phi_{Nv} = 39.5$	V_{c1}	37	$\Phi_A = 35$	V_{c1}	32	$\Phi_B = 35.5$	V_{c1}	34	$\Phi_C = 31$
V_{c2}	42		V_{c2}	33		V_{c2}	39		V_{c2}	28	
$30 \leq \Phi_{Nv0} \leq 160$			$\Phi_A \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$			$\Phi_B \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$			$\Phi_C \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$		
x	yes	no	x	yes	no	x	yes	no	x	yes	no

Tab No. 6.2 Test suspension

Test suspension N $\Phi = 38 \times 10^5 = \lg 6.58$ $6.17 \leq \lg N \leq 6.70$	N	V_{c1}	V_{c1}	Test suspension N_0 $\lg N_0 = \lg N/10 = \lg 5.58$ $5.17 \leq \lg N_0 \leq 5.70$			
	10^{-4}	>165	>165				
	10^{-5}	40	36				
				x	yes		No

Tab No. 6.3 Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Clostridium perfringens* CCM 4435 (ATCC 13124)**

Test concentration (%) / contact time (min) / conditions	Dilution after test procedure	V_{c1}	V_{c2}	$\lg N_a = \lg (\Phi_a \times 10)$	**lg R ($\lg N_0 = 5.58$)**
100*/5/clean	10^0	<14	<14	< 2.15	**≥ 3.43**
40/5/clean	10^0	<14	<14	< 2.15	**≥ 3.43**
20/5/clean	10^0	20	24	2.34	**3.24**

Note: V_c = value is the number of cfu per ml, Φ = average V_{c1} a V_{c2} (1. + 2. duplicate V_c values), N = the number of cfu/ml of the spore test suspension, N_0 = the number of cfu/ml of the bacterial test suspension at the beginning of the contact time = 0, N_a = the number of survivors per ml in the test mixture at the end of the contact time, N_{v0} = the number of cfu/ml of the spore validation test suspension, A,B,C = the number of surviving spores per ml in control tests (A – experimental conditions control, B – membrane filtration validation, C – method validation), lg R = $\lg N_0 - \lg N_a$ = the reduction in viability

* Product can only be tested at a concentration of 80% or less, as some dilution is always produced by adding the test organisms and interfering substance.

** The test strain was used according to client's request.

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

Sample ID: S266/2018
Rep No: 159
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyn France S.A., Vertou
Client: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 8.10.2018
Sample delivered: 10.10.2018
Testing date: 4.12. – 9.12.2018
Delivered amount: 4800 ml, 200 ml
Batch No: 180706/0817-01, 180301/1742

7. Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Clostridium difficile* DSM 1296 (ATCC 9689) **

Tab No. 7.1 Verification of methodology, clean conditions

Validation of suspension (N_{v0})			Validation of selected experimental conditions (A)			Membrane filtration control (B)			Method validation (C) Product conc.: 100%*		
V_{c1}	35	$\Phi_{Nv} = 33$	V_{c1}	28	$\Phi_A = 29.5$	V_{c1}	32	$\Phi_B = 29.5$	V_{c1}	31	$\Phi_C = 28$
V_{c2}	31		V_{c2}	31		V_{c2}	27		V_{c2}	25	
$30 \leq \Phi_{Nv0} \leq 160$			$\Phi_A \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$			$\Phi_B \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$			$\Phi_C \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$		
x	yes	no	x	yes	no	x	yes	no	x	yes	no

Tab No. 7.2 Test suspension

Test suspension N	N	V_{c1}	V_{c1}	Test suspension N_0
$\Phi = 33 \times 10^5 = \lg 6.52$	10^{-4}	>165	>165	$\lg N_0 = \lg N/10 = \lg 5.52$
$6.17 \leq \lg N \leq 6.70$	10^{-5}	29	37	$5.17 \leq \lg N_0 \leq 5.70$
				x yes / No

Tab No. 7.3 Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Clostridium difficile* DSM 1296 (ATCC 9689) **

Test concentration (%) / contact time (min) / conditions	Dilution after test procedure	V_{c1}	V_{c2}	$\lg N_a = \lg (\Phi_a \times 10)$	**lg R ($\lg N_0 = 5.52$)**
100*/5/clean	10^0	<14	<14	< 2.15	**≥ 3.37**
40/5/clean	10^0	<14	<14	< 2.15	**≥ 3.37**
20/5/clean	10^0	48	60	2.73	**2.79**

8. Evaluation of sporicidal activity of the product **F178+F179**

Tab No. 8.1 The efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on test strains – sporicidal activity

Sporicidal activity of the product (EN 13704:2018)						
Strain	Test temperature [°C]	Contact time [min]	Product test concentrations [%]	Interfering substances - conditions	lg R EN 13704:2018	**lg R**
Clostridium sporogenes DSM 1664 (ATCC 19404)	20	5	100*	clean	≥ 3	**> 3**
Clostridium perfringens CCM 4435 (ATCC 13124)**	20	5	100*	clean	≥ 3	**> 3**
Clostridium difficile DSM 1296 (ATCC 9689) **	20	5	100*	clean	≥ 3	**> 3**
Clostridium sporogenes DSM 1664 (ATCC 19404)	20	5	40	clean	≥ 3	**> 3**
Clostridium perfringens CCM 4435 (ATCC 13124)**	20	5	40	clean	≥ 3	**> 3**
Clostridium difficile DSM 1296 (ATCC 9689) **	20	5	40	clean	≥ 3	**> 3**
Clostridium sporogenes DSM 1664 (ATCC 19404)	20	5	20	clean	≥ 3	**> 3**
Clostridium perfringens CCM 4435 (ATCC 13124)**	20	5	20	clean	≥ 3	**> 3**
Clostridium difficile DSM 1296 (ATCC 9689) **	20	5	20	clean	≥ 3	**< 3**

Note: V_c = value is the number of cfu per ml, Φ = average V_{c1} a V_{c2} (1. + 2. duplicate V_c values), N = the number of cfu/ml of the spore test suspension, N_0 = the number of cfu/ml of the bacterial test suspension at the beginning of the contact time = 0, N_a = the number of survivors per ml in the test mixture at the end of the contact time, N_{v0} = the number of cfu/ml of the spore validation test suspension, A,B,C = the number of surviving spores per ml in control tests (A – experimental conditions control, B – membrane filtration validation, C – method validation), lg R = $\lg N_0 - \lg N_a$ = the reduction in viability

* Product can only be tested at a concentration of 80% or less, as some dilution is always produced by adding the test organisms and interfering substance.

** The test strain was used according to client's request.

Prepared by: Ing. Eva Kremlová, Lab Technician

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

Sample ID: S266/2018
Rep No: 159
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyn France S.A., Vertou
Client: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 8.10.2018
Sample delivered: 10.10.2018
Testing date: 4.12. – 9.12.2018
Delivered amount: 4800 ml, 200 ml
Batch No: 180706/0817-01, 180301/1742

Interpretation:
Results of tests are in Tabs.
The tested product **F178+F179,** batch No. 180706/0817-01, 180301/1742, in the concentration 100%(97%)*, 100%(80%)*, 40% and 20%, diluted in distilled water, in the contact time 5 min under clean conditions at temperature 20 °C ± 1 °C by the membrane filtration method **decreased** the number of bacterial spores of *Clostridium sporogenes* DSM 1664 (ATCC 19404), *Clostridium perfringens* CCM 4435 (ATCC 13124)** by at least 3 (lg) orders (EN 13704:2018).

The tested product **F178+F179,** batch No. 180706/0817-01, 180301/1742, in the concentration 100%(97%)*, 100%(80%)* and 40%, diluted in distilled water, in the contact time 5 min under clean conditions at temperature 20 °C ± 1 °C by the membrane filtration method **decreased** the number of bacterial spores of *Clostridium difficile* DSM 1296 (ATCC 9689) ** by at least 3 (lg) orders (EN 13704:2018).

* Product can only be tested at a concentration of 97% (RTU product) or less, as some dilution is always produced by adding the test organisms and interfering substance or product can only be tested at a concentration of 80% or less, as some dilution is always produced by adding the test organisms and interfering substance.
** The test strain was used according to client's request.

Conclusion:
The product **F178+F179** is capable of reducing the number of bacterial spores of the relevant organisms under defined conditions to the declared values, and consequently, may be called sporicidal on *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*.

14.2.2019, Hodonín

Chemila, spol. s.r.o.
Za Dráhou 4386/3
695 01 Hodonín
CZ
č. 1273

.....
Ing. Barbora Stoklásková, Leader of Study

Chemila, spol. s r.o., Za Dráhou 4386/3, Hodonín 69501, Phone +420518340919, chemila@chemila.cz
Chemical and Microbiological Laboratory, Testing Laboratory No. 1273 certified by Czech Accreditation Institute according to ČSN EN ISO/IEC 17025:2005.

Copy No.: 1
Issue No.: 1

Test report No. S266-2/2018

DETERMINATION OF SPORICIDAL (EN 13704:2018) ACTIVITY OF THE PRODUCT **F178+F179**

Sample ID: S266/2018
Sample name: **F178+F179**
Client: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, 44124 Vertou, France
Producer: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, 44124 Vertou, France
Sampling point: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, 44124 Vertou, France

Incoming date:
10.10.2018

Delivery date:
14.2.2019

Hodonín, 14.2.2019

TESTING LABORATORY CERTIFIED BY CZECH ACCREDITATION INSTITUTE
-2-
Chemila, spol. s.r.o.
Za Dráhou 4386/3
69501 Hodonín
CZ
č. 1273

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

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

Sample ID: S266/2018
Rep No: 159
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyn France S.A., Vertou
Client: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 8.10.2018
Sample delivered: 10.10.2018
Testing date: 18.1. – 22.1.2018
Delivered amount: 4800 ml, 200 ml
Batch No: 180706/0817-01, 180301/1742

Subject of testing:
Determination of sporicidal activity of the product.

Identification of the sample:

Name of the product:	**F178+F179**
Batch number:	180706/0817-01 and 180301/1742
Date of manufacture:	6.7.2018 and 1.3.2018
Expiry date:	2019-06
Manufacturer:	Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, 44124 Vertou, France
Incoming date:	10.10.2018
Storage conditions:	5 – 30 °C

Active compounds and concentrations:
F178 – CAS: 64-19-7 Acetic acid <3.5%, CAS: 7722-84-1 Hydrogen peroxide <5%, CAS 79-21-0 Peracetic acid <0.25%
F179 – CAS: 1310-73-2 Sodium hydroxide, surfactant 5-15%

Experimental conditions: **Testing of disinfecting efficiency of chemical disinfecting and antiseptic agents by suspension method**
SOP-M-19-00 (EN 13704:2018)

Period of analysis:	18.1. – 22.1.2019
Test temperature:	20 °C ± 1 °C
Test method:	membrane filtration method
Filtration diluent:	rinsing liquid
Product diluent:	distilled water
Appearance of the product:	colourless liquid
Test concentration:	100% (concentrated)*, 40%, 20%
Contact time:	5 min
Interfering substances:	0.3 g/l BSA (clean conditions)
Test organisms:	*Clostridium difficile* ribotype 027 DSM 27147**
Incubation conditions:	30 °C ± 1 °C, minimum 3 and maximum 7 days

Test procedure:
1. Preparation of the test suspension
2. Preparation of product test solutions (In a 600 ml beaker, place 496.8 g of F178 and neutralize, under stirring, with 24.5 g of F179 neutralizing. The reconstituted solution should have a pH of 4.0 ± 0.25)
3. Quantitative suspension test
4. Incubation and calculation
5. Expression and interpretation of the results

Note:
Sporicidal activity – the capability of a product to produce a reduction in the number of bacterial spores belonging to reference strain of *Bacillus subtilis* under defined conditions by at least a 3 lg reduction (10^3).
* Product can only be tested at a concentration of 80% or less, as some dilution is always produced by adding the test organisms and interfering substance.
** The test strain was used according to the client's request.

The standard:
EN 13704:2018 Chemical disinfectants – Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements (phase 2, step 1) July 2018

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

Sample ID: S266/2018
Rep No: 159
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyn France S.A., Vertou
Client: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 8.10.2018
Sample delivered: 10.10.2018
Testing date: 18.1. – 22.1.2018
Delivered amount: 4800 ml, 200 ml
Batch No: 180706/0817-01, 180301/1742

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

1. Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Clostridium difficile* ribotype 027 DSM 27147**

Tab No. 1.1 Verification of methodology, clean conditions

Validation of suspension (N_{v0})			Validation of selected experimental conditions (A)			Membrane filtration control (B)			Method validation (C) Product conc.: 100%*		
V_{c1}	35	$\Phi_{Nv} = 31.5$	V_{c1}	29	$\Phi_A = 30$	V_{c1}	30	$\Phi_B = 26$	V_{c1}	24	$\Phi_C = 26.5$
V_{c2}	28		V_{c2}	31		V_{c2}	22		V_{c2}	29	
$30 \leq \Phi_{Nv0} \leq 160$			$\Phi_A \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$			$\Phi_B \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$			$\Phi_C \geq 0.5\ \Phi_{Nv0}$		
x	yes	no	x	yes	no	x	yes	no	x	yes	no

Tab No. 1.2 Test suspension

Test suspension N	N	V_{c1}	V_{c1}	Test suspension N_0
$\Phi = 29.5 \times 10^5 = \lg 6.47$	10^{-4}	>165	>165	$\lg N_0 = \lg N/10 = \lg 5.47$
$6.17 \leq \lg N \leq 6.70$	10^{-5}	31	28	$5.17 \leq \lg N_0 \leq 5.70$
				x yes / No

Tab No. 1.3 Testing the efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on *Clostridium difficile* ribotype 027 DSM 27147**

Test concentration (%) / contact time (min) / conditions	Dilution after test procedure	V_{c1}	V_{c2}	$\lg N_a = \lg (\Phi_a \times 10)$	**lg R ($\lg N_0 = 5.47$)**
100*/5/clean	10^0	<14	<14	< 2.15	**≥ 3.32**
40/5/clean	10^{-1}	33	50	3.62	**1.85**
20/5/clean	10^{-2}	56	49	4.72	**0.75**

2. Evaluation of sporicidal activity of the product **F178+F179**

Tab No. 2.1 The efficacy of chemical disinfectant **F178+F179** on test strains – sporicidal activity

Sporicidal activity of the product (EN 13704:2018)						
Strain	Test temperature [°C]	Contact time [min]	Product test concentrations [%]	Interfering substances - conditions	lg R EN 13704:2018	**lg R**
Clostridium difficile ribotype 027 DSM 27147**	20	5	100*	clean	≥ 3	**> 3**
Clostridium difficile ribotype 027 DSM 27147**	20	5	40	clean	≥ 3	**< 3**
Clostridium difficile ribotype 027 DSM 27147**	20	5	20	clean	≥ 3	**< 3**

Note: V_c = value is the number of cfu per ml, Φ = average V_{c1} a V_{c2} (1. + 2. duplicate V_c values), N = the number of cfu/ml of the spore test suspension, N_0 = the number of cfu/ml of the bacterial test suspension at the beginning of the contact time = 0, N_a = the number of survivors per ml in the test mixture at the end of the contact time, N_{v0} = the number of cfu/ml of the spore validation test suspension, A,B,C = the number of surviving spores per ml in control tests (A – experimental conditions control, B – membrane filtration validation, C – method validation), lg R = lg N_0- lg N_a = the reduction in viability
* Product can only be tested at a concentration of 80% or less, as some dilution is always produced by adding the test organisms and interfering substance.
** The test strain was used according to the client's request.

Prepared by: Ing. Eva Kremlová, Lab Technician

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

Sample ID: S266/2018
Rep No: 159
Sample name: **F178+F179**
Sampled: by client
Sampling point: Christeyn France S.A., Vertou
Client: Christeyn France S.A., 31, Rue de la Maladrie, Vertou

Sampling date: 8.10.2018
Sample delivered: 10.10.2018
Testing date: 18.1. – 22.1.2019
Delivered amount: 4800 ml, 200 ml
Batch No: 180706/0817-01, 180301/1742

Interpretation:
Results of tests are in Tabs.
The tested concentrated* product **F178+F179,** batch No. 180706/0817-01, 180301/1742, in the contact time 5 min under clean conditions at temperature 20 °C ± 1 °C by the membrane filtration method **decreased** the number of bacterial spores of *Clostridium difficile* ribotype 027 DSM 27147** by at least 3 (lg) orders (EN 13704:2018).

* Product can only be tested at a concentration of 80% or less, as some dilution is always produced by adding the test organisms and interfering substance.
** The test strain was used according to the client's request.

Conclusion:
The product **F178+F179** is capable of reducing the number of bacterial spores of the relevant organism under defined conditions to the declared values, and consequently, may be called sporicidal on *Clostridium difficile* ribotype 027.

14.2.2019, Hodonín

TESTING LABORATORY CERTIFIED BY CZECH ACCREDITATION INSTITUTE
-2-
Chemila, spol. s r.o.
Za Dráhou 4386/3
695 01 Hodonín
CZ
č. 1273

.....
Ing. Barbora Stoklásková, Leader of Study

Nordic Tersus
Laboratory

Test report No. 9719sd

EVALUATION OF SPORICIDAL ACTIVITY IN THE MEDICAL AREA (EN 17126)

Name of the product: F178+179
Batch number: 180912/1351-01, 180702/1110
Date of test report: 14/6/2019

Client, representative:
Christeyns France
31 Rue de la Maladrie
44124 Vertou
Jérôme Dubourgeois
FRANCE

Nordic Tersus
Laboratory

Test report No. 9719sd

EVALUATION OF SPORICIDAL ACTIVITY IN THE MEDICAL AREA (EN 17126)

Name of the product:	**F178+179**
Batch number:	180912/1351-01, 180702/1110
Order number:	19011
Manufacturer:	Christeyns France
Client, representative:	Christeyns France; 31 Rue de la Maladrie 44124 Vertou; Jérôme Dubourgeois; +33 (0)2 40 57 56 23
Date of delivery:	
Test material conditions:	No specific features, sample in the manufacturers tare
Storage conditions:	In room temperature, dark
Active substance – conc.:	Peracetic acid (79-21-0) <0.2%; Hydrogen peroxide (7722-84-1) <5%
Appearance of the product:	Transparent liquid
Test concentration:	Ready to use
Contact time:	5 min
Interfering substance:	3.0 g/l bovine albumin = clean conditions
Rinsing liquid:	Sodium thiosulphate 3 g/l
Neutralizer:	-
Test organisms:	*Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Bacillus cereus* CIP 105151
Testing method:	**EVS-EN 17126:2018** **Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity in the medical area.**
Testing date:	20.05.2019 – 29.05.2019
Results:	look appendix 1-2

ACCREDITED LABORATORY No L263. ISO/IEC 17025 NORDIC TERSUS LABORATORY OÜ REPUBLIC OF ESTONIA

.....

Allar Laaneleht
Chief specialist
Date of test report: 14.06.2019

Nordic Tersus Laboratory OÜ
Harjumaa, Tallinn, Serva tn 44a, 11618
Registrikood: 12561442
Tel: +372 503 0197
E-mail: info@ntl.ee

Appendix 1

TEST RESULTS (sporicidal quantitative suspension test)

EVS-EN 17126:2018; Phase 2, step 1;
Membrane filtration method;
Rinsing liquid: Tryptone 1 g/l + NaCl 9 g/l;
Test organism: Polysorbate 80, 5g/l + L-histidine, 0.5g/l;
Test temperature: +20° C; Incubation temperature: +37° C
Interfering substance: 3.0 g/l bovine albumin = clean conditions;
Nordic Tersus Laboratory LLC.; Date of test: 20.05.2019
Responsible person: Allar Laaneleht

Validation and controls

Clean conditions

Validation suspension N_{vo}			Experimental conditions (A)			Neutralizer control (B)			Method validation (C)		
V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$
92	81	86.5	73	90	81.5	66	72	69	58	73	65.5
$30 \leq \bar{x}$ N_{vo} ≤160?yes X; no □			$\bar{x}$ A is ≥ 0.5 $\bar{x}$ N_{vo}?yes X;no □			$\bar{x}$ **B** is ≥ 0.5 $\bar{x}$ N_{vo}? yesX; no □			$\bar{x}$ **C** is ≥ 0.5 $\bar{x}$ N_{vo}? yes X;no □		

Test suspension and test

Testsuspension:	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}_{wm} = 2.50 \times 10^8$; $\log N = 8.40$
N and N_0	10^{-6}	**266**	**242**	$N_0 = N/100$; $\log N_0 = 6.40$
	10^{-7}	**23**	**19**	$6.17 \leq \log N_0 \leq 6.70$; yesX; no □

Experimental results

Concentration of the product	Dilution step	V_{C1}	V_{C2}	Na (=$\bar{x}$*10)	log Na	logR	Contact time	Conditions
Ready to use	-	<14	<14	<140	<2.15	>4.25	5 min	Clean

Explanations:

V_C = count per ml (one plate or more)

$\bar{x}$ = average of V_{C1} and V_{C2} (1. + 2. duplicate)

N = cfu/ml microbes in testsuspension

N_0 = cfu/ml at the start of the contact time (t=0)

N_{vo} = cfu/ml in the validation suspension (t=0)

Na = surviving microbes after the test

R = reduction factor (R= N_0/ Na; LogR=LogN_0 - Log Na)

Appendix 2

TEST RESULTS (sporicidal quantitative suspension test)

EVS-EN 17126:2013; Phase 2, step 1;
Membrane filtration method;
Rinsing liquid: Polysorbate 80, 5g/l + L-histidine, 0.5g/l;
Test organism: *Bacillus cereus* CIP 105151;
Test temperature: +20° C; Incubation temperature: +37° C
Interfering substance: 3.0 g/l bovine albumin = clean conditions;
Nordic Tersus Laboratory LLC.; Date of test: 29.05.2019
Responsible person: Allar Laaneleht

Validation and controls

Clean conditions

Validation suspension N_{vo}			Experimental conditions (A)			Neutralizer control (B)			Method validation (C)		
V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$
73	86	79.5	93	62	77.5	65	52	58.5	72	64	61
30 ≤ $\bar{x}$ N_{vo} ≤160?yes X; no □			$\bar{x}$ A is ≥ 0.5 $\bar{x}$ N_{vo}?yes X;no □			$\bar{x}$ **B** is ≥ 0.5 $\bar{x}$ N_{vo}? yesX; no □			$\bar{x}$ **C** is ≥ 0.5 $\bar{x}$ N_{vo}? yes X;no □		

Test suspension and test

Testsuspension: *N and N_0*	*N*	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}_{wm} = 2.05 \times 10^8$; log*N* = 8.31 $N_0 = N/100$; logN_0 = 6.31 6.17≤ logN_0≤6.70; yesX; no □
	10^{-6}	**197**	**214**	
	10^{-7}	**24**	**16**	

Experimental results

Concentration of the product	Dilution step	V_{C1}	V_{C2}	Na (=$\bar{x}$*10)	log Na	logR	Contact time	Conditions
Ready to use	-	<14	<14	<140	<2.15	>4.16	5 min	Clean

Explanations:

V_C = count per ml (one plate or more)

$\bar{x}$ = average of V_{C1} and V_{C2} (1. + 2. duplicate)

N = cfu/ml microbes in testsuspension

N_0 = cfu/ml at the start of the contact time (t=0)

N_{vo} = cfu/ml in the validation suspension (t=0)

Na = surviving microbes after the test

R = reduction factor (R= N_0/ *Na;* LogR=LogN_0 - Log *Na*)

Appendix 2

Interpretation:

The ready to use product **F178+F179** (batch no. 180912/1351-01, 180702/1110) was tested according to the test method EVS-EN 17126:2018. The test was performed at 20 °C ± 1 °C, under clean conditions during contact times of 5 min. The membrane filtration method was used for testing the product's effectiveness against the reference strains *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Bacillus cereus* CIP 105151. Under clean conditions the tested product was effective against the reference strains within 5 min.

Conclusion:

The surviving count of the reference strains showed at least 4 lg reduction meaning that **the ready to use product F178+F179 is effective against *B.subtilis* and *B.cereus* under clean conditions within 5 min.**

ACCREDITED LABORATORY. No L263. ISO/IEC 17025
NORDIC TERSUS LABORATORY
REPUBLIC OF ESTONIA

.....

Allar Laaneleht

Chief specialist

14.06.2019

Nordic Tersus
Laboratory

Test report No. 11819sd

EVALUATION OF SPORICIDAL ACTIVITY IN THE MEDICAL AREA (EN 17126)

Name of the product: F178+F179
Batch number: 180912/1351-01; 180702/1110
Date of test report: 16/9/2019

Client, representative:
Christeyns France
31 Rue de la Maladrie
44124 Vertou
Jérôme Dubourgeois
FRANCE

Nordic Tersus
Laboratory

Test report No. 11819sd

EVALUATION OF SPORICIDAL ACTIVITY IN THE MEDICAL AREA (EN 17126)

Name of the product:	**F178+F179**
Batch number:	180912/1351-01; 180702/1110
Order number:	19011
Manufacturer:	Christeyns France
Client, representative:	Christeyns France; 31 Rue de la Maladrie 44124 Vertou; Jérôme Dubourgeois; +33 (0)2 40 57 56 23
Date of delivery:	13.06.2019
Test material conditions:	No specific features, sample in the manufacturers tare
Storage conditions:	In room temperature, dark
Active substance – conc.:	Peracetic acid (79-21-0) <0.2%; Hydrogen peroxide (7722-84-1) <5%
Appearance of the product:	Transparent liquid
Test concentration:	Ready to use
Contact time:	5 min
Interfering substance:	0.3 g/l bovine albumin = clean conditions
Rinsing liquid:	Sodium thiosulphate 3 g/l
Neutralizer:	-
Test organisms:	*Clostridium difficile* NCTC 13366
Testing method:	**EVS-EN 17126:2018** **Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity in the medical area.**
Testing date:	09.09.2019 – 16.09.2019
Results:	look appendix 1-2

Reg. No.: 12561442
NORDIC TERSUS LABORATORY OÜ
REPUBLIC OF ESTONIA

.....

Nele Aas-Valleriani
Microbiologist
Date of test report: 16.09.2019

Nordic Tersus Laboratory OÜ
Harjumaa, Tallinn, Serva tn 44a, 11618
Registrikood: 12561442
Tel: +372 503 0197
E-mail: info@ntl.ee

TEST RESULTS (sporicidal quantitative suspension test)

EVS-EN 17126:2018; Phase 2, step 1;
Membrane filtration method;
Rinsing liquid: Sodium thiosulphate 3 g/l;
Test organism: *Clostridium difficile NCTC 13366;*
Test temperature: +20° C; Incubation temperature: +37° C
Interfering substance: 0.3 g/l bovine albumin = clean conditions;
Nordic Tersus Laboratory LLC.; Date of test: 09.09.2019
Responsible person: Nele Aas-Valleriani

Validation and controls

Clean conditions

Validation suspension N_{vo}			Experimental conditions (A)			Neutralizer control (B)			Method validation (C)		
V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$
92	84	88	66	74	70	49	63	56	52	57	54.5
30 ≤ $\bar{x}$ N_{vo} ≤160?yes X; no □			$\bar{x}$ A is ≥ 0.5 $\bar{x}$ N_{vo}?yes X;no □			$\bar{x}$ **B** is ≥ 0.5 $\bar{x}$ N_{vo}? yesX; no □			$\bar{x}$ **C** is ≥ 0.5 $\bar{x}$ N_{vo}? yes X;no □		

Test suspension and test

Testsuspension:	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}_{wm} = 1.82 \times 10^7$; log$N$ = 7.26
N and N_0	10^{-5}	**191**	**172**	$N_0 = N/10$; logN_0 = 6.26
	10^{-6}	**20**	**18**	6.17≤ logN_0≤6.70; yesX; no □

Experimental results

Concentration of the product	Dilution step	V_{C1}	V_{C2}	Na (=$\bar{x}$*10)	log Na	logR	Contact time	Conditions
Ready to use	-	<14	<14	<140	<2.15	>4.11	5 min	Clean

Explanations:

V_C = count per ml (one plate or more)

$\bar{x}$ = average of V_{C1} and V_{C2} (1. + 2. duplicate)

N = cfu/ml microbes in testsuspension

N_0 = cfu/ml at the start of the contact time (t=0)

N_{vo} = cfu/ml in the validation suspension (t=0)

Na = surviving microbes after the test

R = reduction factor (R= N_0/ Na; LogR=LogN_0 - Log Na)

Appendix 2

Interpretation:

The ready to use product **F178+F179** (batch no. 180912/1351-01; 180702/1110) was tested according to the test method EVS-EN 17126:2018. The test was performed at 20 °C ± 1 °C, under clean conditions during contact time of 5 min. The membrane filtration method was used for testing the product's effectiveness against the reference strain *Clostridium difficile* NCTC 13366. Under clean conditions the tested product was effective against the reference strain within 5 min.

Conclusion:

The surviving count of the reference strains showed at least 4 lg reduction meaning that **the ready to use product F178+F179 is effective against *Clostridium difficile* under clean conditions within 5 min.**

Reg. No.: 12561442
NORDIC TERSUS LABORATORY OÜ
REPUBLIC OF ESTONIA

Nele Aas-Valleriani

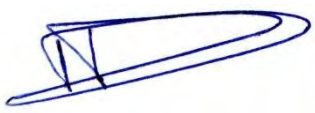
Microbiologist

Date 16.09.2019

Etude de compatibilité des matériaux par immersion

Délivré à :	Division santé Phagogène
Produit testé :	Phagoscope APA
Matériaux testés :	Acier inoxydable 304L et 316L, aluminium 5083 et anodisé, titane, PVC, PEHD, ABS, PTFE, Polyuréthane, Polycarbonate Makrolon 099, PMMA Röhm Plexiglas XT 20070FF
Essai :	Validation de la compatibilité d'un bain d'acide peracétique avec des matériaux plastiques et métalliques selon le protocole de la norme NF S 94-402-1
Réalisation des essais :	du 02/02/2015 au 27/02/15
Rapport émis le :	29/04/2015

Jérôme DUBOURGEOIS
Responsable des essais



1. Principe :

Cette étude permet d'évaluer l'action corrosive d'un désinfectant sur des matériaux utilisés dans la conception d'instruments médico-chirurgicaux réutilisables.
Les essais mis en œuvre incluent le suivi de la masse des plaques ainsi qu'examen visuel après séchage.

2. Conditions opératoires :

Echantillon testé : Phagoscope APA PR171-20 + neutralisant PR171-N10 : pH = 4

Concentration : produit prêt à l'emploi après neutralisation

Temps de contact : 100 min d'immersion

Température : Température ambiante (18 – 22°C)

Nombre de cycles : 5 cycles de 100 min soit 50 cycles de 10 minutes.

Rinçage : eau adoucie

Séchage : égouttage à l'air libre

3. Manipulations :

a. Préparation des plaques

Les plaques sont nettoyées à l'aide d'un détergent neutre, rincées à l'eau distillée puis séchées à air libre.

Les plaques sont ensuite identifiées avec une étiquette, pesées et photographiées.

b. Préparation de la solution à analyser

Introduire dans un bêcher, 986g de PR171-F20 et 46,8g de PR171-N10. Agiter jusqu'à complète homogénéisation.

Vérifier que la solution est à pH de 4,0 ± 0,25.

a. Préparation du bain et simulation des conditions d'utilisations

1) Dans un flacon en PEHD, introduire 100 ml de solution à analyser.
2) Immerger une plaque par flacon, trois plaques du même matériau sont testées en parallèles
3) Fermer le flacon.
4) Immergé en parallèle, une plaque dans l'eau adoucie.
5) Les plaques sont immergées 50 fois successivement dans la solution d'essai.
6) Tous les 10 cycles, la plaque doit être rincée dans l'eau adoucie, séchée à l'air libre puis la plaque est pesée et photographiée par rapport à une plaque témoin.
7) La solution à analyser doit être changée tous les 10 cycles.

4. Résultats :

Matériaux	50 cycles de 10 minutes de désinfection
Acier inoxydable 304L	compatible
Acier inoxydable 316L	compatible
Aluminium 5083	peu compatible *
Aluminium anodisé	compatible
Titane	compatible
Polychlorure de vinyle (PVC)	compatible
Polyéthylène haute densité (PEHD)	compatible
Polypropylène (PP)	compatible
PMMA Röhm Plexiglas XT 20070FF	compatible
Polycarbonate Makrolon 099	compatible
Acrylonitrile butadiène styrène (ABS)	compatible
Tétra-fluoroéthylène (PTFE)	compatible
Polyuréthane (PU)	compatible

* Faible perte de masse mesurée sur la plaque d'Aluminium, une légère oxydation forme un dépôt blanc en surface.

CHRISTEYNS

Etude de compatibilité des matériaux avec contraintes par immersion

Délivré à : Division santé Phagogène

Produit testé : Phagoscope APA

Matériaux testés : PMMA Röhm Plexiglas XT 20070FF, Polycarbonate Makrolon 099

Essai : Validation de la compatibilité d'un bain d'acide peracétique avec des matériaux plastiques soumis à une contrainte physique par immersion

Réalisation des essais : du 16/03/2015 au 20/03/15

Rapport émis le : 29/04/2015

Jérôme DUBOURGEOIS
Responsable des essais

CHRISTEYNS

1. Principe :

Cette étude permet d'évaluer l'action corrosive d'un désinfectant sur des matériaux utilisés dans la conception d'instruments médico-chirurgicaux réutilisables.
Les essais mis en œuvre incluent examen visuel après séchage des matériaux plastiques ayant subi une contrainte physique (courbure) lors de l'immersion.

2. Conditions opératoires :

Echantillon testé : Phagoscope APA PR171-20 + neutralisant PR171-N10 : pH = 4

Concentration : produit prêt à l'emploi après neutralisation

Temps de contact : 100 min d'immersion

Température : Température ambiante (18 – 22°C)

Nombre de cycles : 5 cycles de 100 min soit 50 cycles de 10 minutes.

Rinçage : eau adoucie

Séchage : égouttage à l'air libre

3. Manipulations :

a. Préparation des plaques

Les plaques sont nettoyées à l'aide d'un détergent neutre, rincées à l'eau distillée puis séchées à air libre.

Les plaques sont ensuite identifiées avec une étiquette et photographiées.

b. Préparation de la solution à analyser

Introduire dans un bêcher, 1972g de PR171-F20 et 93,6g de PR171-N10. Agiter jusqu'à complète homogénéisation.

Vérifier que la solution est à pH de 4,0 ± 0,25.

a. Préparation du bain et simulation des conditions d'utilisations

1) Dans un bac en PEHD, introduire 2 litres de solution à analyser.
2) Disposer les lames de plastiques sur le support afin d'obtenir une courbe de celle-ci.
3) Immerger les supports dans la solution précédemment préparée, trois plaques du même matériau sont testées en parallèles
4) Fermer le bac.
5) Immergé en parallèle un support dans l'eau adoucie.
6) Les plaques sont immergées 50 fois successivement dans la solution d'essai.
7) Tous les 10 cycles, la plaque doit être rincée dans l'eau adoucie, séchée à l'air libre puis la plaque est pesée et photographiée par rapport à une plaque témoin.
8) La solution à analyser doit être changée tous les 10 cycles.

CHRISTEYNS

4. Résultats :

- PMMA Plexiglas XT 20070FF

Le plastique reste parfaitement transparent et la couleur ne change pas. On n'observe aucune détérioration de la lamelle.

- Polycarbonate Makrolon

Le plastique reste parfaitement transparent et la couleur ne change pas. On observe cependant des craquelures allant jusqu'à la rupture de la lamelle.

5. Conclusion :

Le PMMA Plexiglas est compatible avec la Phagoscope APA lors lorsqu'il est immergé dans celui-ci pendant 50 cycles avec une contrainte physique (courbure).

Le Polycarbonate Makrolon n'est pas compatible avec la Phagoscope APA lors lorsqu'il est immergé dans celui-ci pendant 50 cycles avec une contrainte physique (courbure).

LABORATOIRE DE TRAPPES
29 avenue Roger Hennequin – 78197 Trappes Cedex
Tél. : 01 30 69 10 00 – Fax : 01 30 69 12 34

RAPPORT D'ESSAI
TEST REPORT

Ce document annule et remplace le rapport d'essai P114752 – Document DE/1
This document cancels and replaces File P144752-Document DE1

Demandeur : ***Requester:***	Mr Jérôme DUBOURGEOIS CHRISTEYNS France 31 Rue de la Maladrie PI de la Vertonne 44120 VERTOU France
Objet : ***Purpose:***	Etude de l'action corrosive d'un pré-désinfectant ou d'un nettoyant ou d'un désinfectant sur les instruments médico-chirurgicaux réutilisables *Study of the corrosive action of a pre-disinfectant or cleaner or disinfectant on reusable surgical instruments*
Documents de référence : ***Reference documents:***	Standard NF S 94-402-1 Mai 2004 *International standard NF S 94-402-1 May 2004*
Identification des échantillons : ***Sample identification:***	Référence : Pastilles aciers répondant aux exigences de nuance et traitement du standard NF S 94-402-1 Mai 2004 + Solution 1264 mélange acide acétique, péroxyde d'hydrogène et acide péracétique + Solution 1265 neutralisant lessive de soude + TA non ionique *Reference: Steel samples in accordance with treatment and grade requirements of NF S 94-402-1 May 2004 + Solution of 1264 with acetic acid, hydrogen peroxide & peracetic acid + Solution of neutralizing 1265 with sodium hydroxide & nonionic TA*

1. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS
SAMPLE IDENTIFICATION

Une pastille en acier inoxydable martensitique X30Cr13 à l'état de traitement thermique suivant NF EN 10088 a été réceptionnée au sein du Département Propriétés Physico-chimiques des Matériaux du Laboratoire National de métrologie et d'Essais (L.N.E.). Les exigences de traitement thermique pour cette pastille d'acier sont une trempe air/huile à 950/1000°C, suivie d'un revenu à 200/250°C conduisant à une dureté > 49HRC. La surface exposée de l'échantillon à la solution électrolytique est de 1cm².
Deux solutions, 1264 et 1265 ont été réceptionnées au sein du Département Propriétés Physico-chimiques des Matériaux du Laboratoire National de métrologie et d'Essais (L.N.E.). La solution 1264 est un mélange acide acétique, péroxyde d'hydrogène et acide péracétique. La solution 1265 est un neutralisant constitué de lessive de soude et TA non ionique.

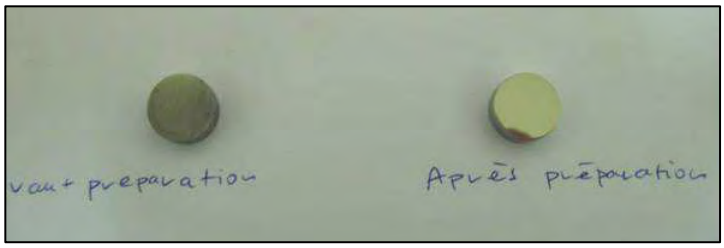
One sample in martensitic stainless steel X30Cr13 with thermal treatment in accordance with standard NF EN 10088 was received in the Pysico-chemical dpt in LNE. The heat treatment required for this steel is air/oil hardening 950/1000°C, followed by annealing to 200/250°C leading to a hardness > 49HRC. The surface exposed to the electrolyte is 1cm².
Two solutions, 1264 & 1265, were received in the Pysico-chemical dpt in LNE. The 1264 solution is a mixture of acetic acid, hydrogen peroxide and peracetic acid. The 1265 solution is a neutralizing solution of sodium hydroxide and non-ionic TA.

2. PREPARATION DES ECHANTILLONS
SAMPLE PREPARATION

A. ECHANTILLON D'ACIER
STAINLESS STEEL SAMPLE

Conformément aux exigences du standard NF S 94-402-1, l'échantillon a été polie et examiné x20 pour vérifier qu'il ne comportait ni trous ni piqûres préalables. L'échantillon a été poli jusqu'au grade 1µm puis nettoyé et séché. La surface exposée est de 1cm². Pour éviter toute passivation, l'échantillon a été testé en suivant de sa préparation.

Under the requirements of standard NF S 94-402-1, the sample was polished up to 1µm grade and examined by microscope at magnification x20 to verify holes and pits were missing before test. The sample was then cleaned and dried. The exposed area is 1cm². To avoid passivation before test, the sample was exposed and tested just after its preparation.



Cliché 1 : Cliché des échantillons avant et après préparation
Picture 1*: Picture of the samples before and after polishing preparation*

B. SOLUTION À TESTER / ELECTROLYTE
TEST SOLUTION / ELECTROLYTE

Conformément aux exigences du client, la solution 1265 a été aditivée à la solution 1264. 20g de la solution 1265 a été ajoutée à 493g de la solution 1264. La solution a été agitée mécaniquement (agitateur magnétique) et le pH a été mesuré. Le pH mesuré avant exposition est de 3.80unitées pH (exigence client à 4.0±0.25). La température de préparation de la solution est de 23.2°C.

In accordance with customer requirements, the solution 1265 was added to the solution 1264. 20gr of 1265 solution was added to 493gr of 1264 solution. The mixture was stirred (magnetic) and the pH was measured at 3.80pH units (customer requirement 4.0±0.25). The temperature was 23.2°C.

3. TEST SUIVANT NF S 94-402-1 : METHODE D'ESSAI ELECTROCHIMIQUE §6
TEST IN ACCORDANCE WITH NF S 94-402-1: ELECTROCHEMICAL TEST METHOD §6

A. DETERMINATION DU POTENTIEL LIBRE DE CORROSION
DETERMINATION OF FREE POTENTIAL CORROSION

La température du test est de 23.5°C. La solution constituée du mélange 1264 & 1265 est légèrement agitée. Un montage à trois électrodes est utilisé pour mesurer le potentiel libre de corrosion. L'électrode de travail constituée de l'acier (1cm²), une contre électrode en platine et une électrode de référence au calomel saturé ECS. Ceci signifie que tous les potentiels exprimés sont par rapport à l'ECS.
La méthode a été définie pour 15minutes avec une interruption automatique en cas de stabilisation avec comme critère ±1mV sur 10 mesures (1 mesure par sec). La stabilisation a été obtenue après 8minutes d'exposition.

Test temperature is 23.5°C. The solution of mixture 1264 + 1265 is slightly stirred. A three electrodes system is used to measure the free potential corrosion. Working electrode consists of stainless steel (1cm²), counter electrode is platinum probe and the reference electrode is sutured calomel SCE. This means that all the potentials are expressed relative to the SCE. The method was set for 15min with automatic interruption in case of stabilization (criteria is ±1mV during 10 measures with 1 measure per sec). Stabilization was achieved after 8min of exposure. The potentiodynamic method was automatically started.

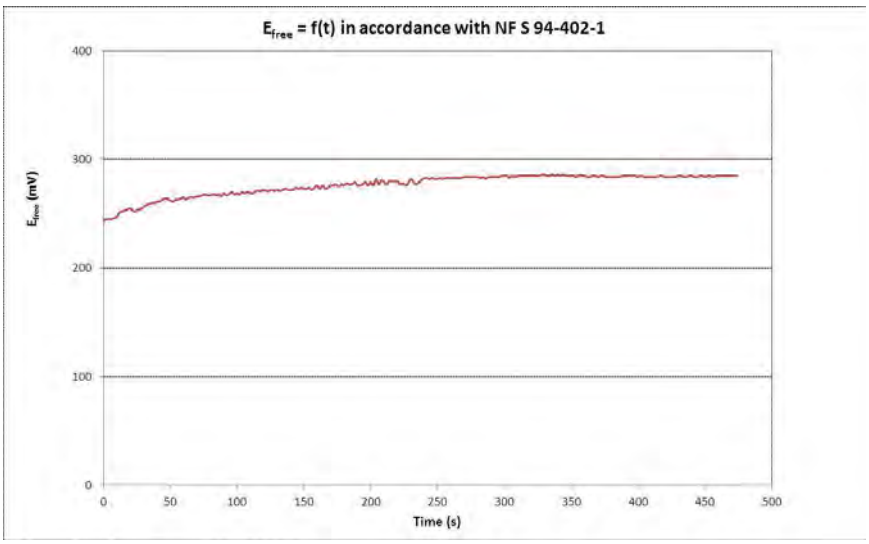


Figure 1 : Suivi du potentiel libre
Figure 1*: Free potential measurement*

B. MESURE POTENTIODYNAMIQUE
POTENTIODYNAMIC MEASUREMENT

Après la détermination du potentiel libre de corrosion, la chronoampérométrie à variation linéaire de potentiel a débuté. Le balayage a été réalisé à partir du potentiel libre de corrosion vers les potentiels les plus positifs en stoppant pour un critère de densité de courant à 500µA/cm². Le balayage inverse a été réalisé jusqu'à un potentiel proche de E_H. Le balayage retour n'est pas présenté ici. Le phénomène d'hystérésis est négligeable. Le balayage en potentiel en sens aller et retour a été réalisé à 0.2mV/s.

After free corrosion potential determination, the chronoamperometry with linear potential variation started. Scanning was performed from the free potential corrosion to the most positive potential by stopping for a current density of 500µA/cm² as criteria. The reverse scan was performed to a potential close to E_H. Scanning return is not presented here. No hysteresis processing. The scanning was performed at 0.2mV/s.

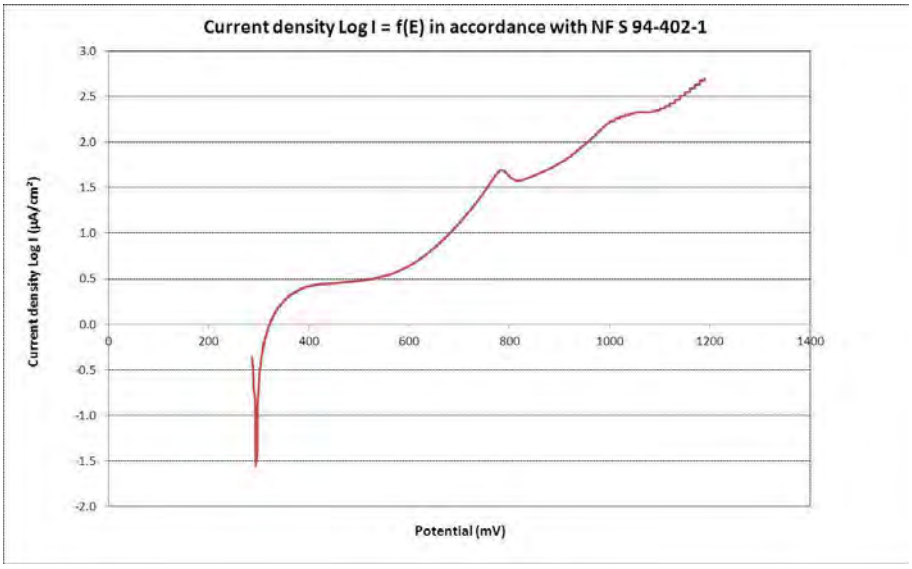


Figure 2 : Chronoampérométrie
***Figure 2**: Chronoamperometry*

4. RÉSULTATS
RESULTS

Les résultats sont exprimés en potentiel ou densité de courant par rapport à l'électrode au calomel saturé ECS. Ces résultats ne valent que pour le couple pastille acier et solution mélange 1264/1265.

These results are expressed in potential or current density vs SCE and validated only for the couple Steel sample/mixture solution 1264-1265.

Test temperature	Solution pH		E_{free} (mV/SCE)	E_a (mV/SCE)	E_p (mV/SCE)
23.5°C	Before exposure	After exposure	285	468	590
	3.80	3.79			

Tableau 1 : Résultats des tests potentiel libre et chronoampérométrie

***Table 1**: Free corrosion potential and chronoamperometry results*

5. CONCLUSION
CONCLUSION

Au regard des résultats d'essais, il a été démontré que la solution constituée du mélange référencé 1264 + 1265, dans les quantités indiquées par le client, ne présente pas de caractère corrosif par piqûres vis à vis de l'acier inoxydable X30Cr13 dans des conditions d'emplois prévues à son utilisation. Cette conclusion est justifiée par l'absence de traces de corrosion ou de piqûres à la surface des échantillons après tests. De plus, le potentiel de piqûre est fortement excentré vers les potentiels positifs et très supérieur au potentiel libre et au potentiel de corrosion.

In view of these test results, it was demonstrated that the solution consisting of the mixture 1264 + 1265, in the amounts indicated by the customer, shows no pitting corrosion vs stainless steel X30Cr13 in the conditions of employment provided for use. This conclusion is substantiated by the absence of corrosion marks or pits on the surface of samples after testing. In addition, the pitting potential is heavily offset towards the positive potential and much higher than the free potential and the corrosion potential.

Trappes, le 20 Juillet 2015
Trappes, 2015-07-20

Le responsable technique

Laboratoire national de métrologie et d'essais · LNE

Jonathan IDRAC

Les résultats mentionnés ne sont applicables qu'aux échantillons, aux produits ou aux matériels soumis au LNE et tels qu'ils sont définis dans le présent document.
The results mentioned only apply to the samples, products or materials submitted to LNE and as defined in this document.

CHRISTEYNS

Etude de compatibilité d'un endoscope par immersion

Délivré à : Division santé Phagogène

Produit testé : Phagoscope APA

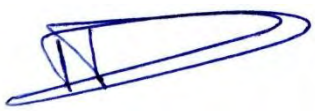
Matériel testé : Endoscope souple OLYMPUS GIF-V2

Essai : Validation de la compatibilité d'un bain d'acide peracétique avec des matériaux plastiques et métalliques selon le protocole de la norme NF S 94-402-1

Réalisation des essais : du 27/03/2015 au 08/05/15

Rapport émis le : 14/05/2015

Jérôme DUBOURGEOIS
Responsable des essais



1. Principe :

Cette étude permet d'évaluer l'action corrosive d'un désinfectant sur un endoscope souple.
Après trempage répété de l'endoscope dans un bain de désinfectant, celui-ci est étudié par examen visuel après séchage.

2. Conditions opératoires :

Echantillon testé : Phagoscope APA PR171-20 + neutralisant PR171-N10 : pH = 4

Concentration : produit prêt à l'emploi après neutralisation

Temps de contact : 100 min d'immersion

Température : Température ambiante (18 – 22°C)

Nombre de cycles : 5 cycles de 100 min soit 50 cycles de 10 minutes.

Rinçage : eau adoucie

Séchage : égouttage à l'air libre

3. Manipulations :

a. Préparation de la solution à analyser

Dans un bac de 10L, introduire 4930g de PR171-F20 et 234g de PR171-N10. Agiter jusqu'à complète homogénéisation.

Vérifier que la solution est à pH de 4,0 ± 0,25.

a. Préparation du bain et simulation des conditions d'utilisations

1) Immerger l'endoscope dans le bain de désinfectant précédemment préparé.
2) Fermer le bac.
3) L'endoscope est immergé 50 fois successivement dans la solution d'essai.
4) Tous les 10 cycles, l'endoscope doit être rincé dans l'eau adoucie, séché à l'air libre puis examiné visuellement.
5) La solution à analyser doit être changée tous les 10 cycles.

4. Résultats :

Après 50 cycles de 10 min dans la solution désinfectante, l'endoscope ne montre aucune détérioration visuelle.

Les commandes de contrôle ainsi que la fibre optique sont opérationnelles à l'issu des essais.

Les inscriptions figurant sur le tube d'insertion n'ont subi aucune détérioration

5. Conclusion :

L'endoscope testé est compatible avec la solution de Phagoscope APA neutralisée après 50 immersions de 10min selon le protocole de la norme NF S 94-402-1