

DOSSIER SCIENTIFIQUE

# PHAGO'SPRAY DM

Nettoyant désinfectant hydro-alcoolique pour la désinfection des surfaces.



Christeyns France – Division Santé  
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.phagogene.fr](http://www.phagogene.fr)

# SOMMAIRE

1. INTRODUCTION .....	3
2. COMPOSITION .....	3
3. CARACTÉRISTIQUES ORGANOLEPTIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES .....	3
4. MODE D’EMPLOI ET CONDITIONS D’UTILISATION.....	4
5. ACTIVITÉ NETTOYANTE ET DÉTERGENTE.....	4
6. ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE .....	5
7. RÈGLEMENTATION PRODUIT - CONDUITES D’URGENCE.....	6
8. COMPATIBILITÉS.....	6
9. INCOMPATIBILITÉS .....	6
10. CONSERVATION .....	7
11. CONDITIONNEMENTS.....	7
12. ANNEXES .....	7

## 1. INTRODUCTION

- ✓ Le **PHAGO'SPRAY DM** est un nettoyant désinfectant professionnel pour la désinfection des surfaces dans les environnements à risques.
- ✓ Le **PHAGO'SPRAY DM** est une solution hydro-alcoolique prête à l'emploi qui s'utilise en pulvérisation sur les murs, les plafonds et le mobilier des services de soins et de chirurgie.
- ✓ Le **PHAGO'SPRAY DM** est utilisé pour la désinfection rapide.
- ✓ Le **PHAGO'SPRAY DM** peut être aussi utilisé en application avec un linge à usage unique pour la désinfection rapide du petit mobilier, des chariots, des petites surfaces proches du malade, susceptibles de présenter un risque important de transmission de maladies nosocomiales.
- ✓ Le **PHAGO'SPRAY DM** peut être également utilisé pour la désinfection des surfaces extérieures des dispositifs médicaux non invasifs.
- ✓ Le **PHAGO'SPRAY DM** peut être utilisé, avec rinçage, à l'eau sur les surfaces pouvant se trouver en contact direct avec les denrées alimentaires (conformément à l'arrêté du 8 septembre 1999).
- ✓ Le **PHAGO'SPRAY DM** se distingue par son large spectre bactéricide, fongicide et virucide qui fait de celui-ci un produit de choix dans les lieux à hauts risques.

## 2. COMPOSITION

- ✓ Substances actives
  - Ethanol (N° CAS : 64-17-5) : 24% m/m
  - Chlorure de didécyltriméthylammonium (N° CAS : 7173-51-5) : 0,14 % m/m
  - Alkylamine (N° CAS : 2372-82-9) : 0,25% m/m
- ✓ Parfum : pamplemousse

## 3. CARACTÉRISTIQUES ORGANOLEPTIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES

- ✓ Aspect : liquide limpide
- ✓ Couleur : incolore
- ✓ Odeur : pamplemousse
- ✓ pH à 20°C (produit pur) : 9,5 à 11,0
- ✓ Masse volumique à 20°C (g/ml) : 0,968 ± 0,005

#### 4. MODE D'EMPLOI ET CONDITIONS D'UTILISATION

Le **PHAGO'SPRAY DM** est un produit prêt à l'emploi. Ne pas diluer.

Le **PHAGO'SPRAY DM** possède une tête de pulvérisateur dotée d'une buse avec deux positions identifiables par les pictogrammes spray et stop.

De plus, au bout de la buse est positionnée un ergo amovible pour une utilisation du produit **PHAGO'SPRAY DM** en pulvérisation mousse ou spray.

Dans les cas de souillures importantes, nettoyer une première fois les surfaces à désinfecter au moyen d'un tissu imprégné de **PHAGO'SPRAY DM** et appliquer de nouveau le **PHAGO'SPRAY DM** sur la surface propre, laisser sécher.

##### Mode d'emploi :

- ✓ Pulvériser sur un linge à usage unique et/ou appliquer sur la surface à désinfecter
- ✓ Laisser agir 5 minutes pour une activité bactéricide ou 15 minutes pour un spectre complet
- ✓ Ne pas rincer \*

Préférer l'emploi d'un linge à usage unique pour éviter les émanations dans l'air.

*\* Dans le cas de désinfection de surfaces pouvant entrer en contact direct avec les denrées alimentaires, un rinçage à l'eau potable est nécessaire (arrêté du 8 septembre 1999).*

##### Conditions d'utilisation :

- ✓ Pour les petites surfaces : utiliser le pulvérisateur monté sur le flacon, une pression délivre 1,25 ml de **PHAGO'SPRAY DM**.
- ✓ Pour les parois verticales : pulvériser à une concentration de 15 à 20 ml/m<sup>2</sup>, ce qui représente, une surface de 50 à 65 m<sup>2</sup> par litre de **PHAGO'SPRAY DM**.
- ✓ Ne pas utiliser en machines de désinfection terminale. Utiliser en sprayeur.

#### 5. ACTIVITÉ NETTOYANTE ET DÉTERGENTE

- ✓ La proportion relative en tensio-actifs permet au **PHAGO'SPRAY DM** d'éliminer sans peine les salissures, sans laisser de traces sur les surfaces.

## 6. ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE

NORMES	CONCENTRATION	TEMPS (MINUTES)	N° RAPPORT ET DATE	LABORATOIRE D’EXPERTISE
<b><u>BACTÉRICIDE</u></b>				
<b>EN 1040</b> ( <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i> )	0,5%	1 min.	2008/040 du 16/10/2008	Laboratoire Rivadis
<b>EN 1276</b> cond. propreté ( <i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i> , <i>E.hirae</i> )	80%	15 min.	31/07/2008	Blu Scientific
<b>EN 13697</b> cond. propreté ( <i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i> , <i>E.hirae</i> )	100%	5 min.	24/08/2008	Blu Scientific
<b>EN 13697</b> cond. saleté ( <i>S.typhimurium</i> )	10%	5 min.	24/08/2008	Blu Scientific
<b>EN 13727</b> cond. saleté ( <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i> , <i>E.hirae</i> )	50%	5 min.	22/09/2008	Blu Scientific
<b><u>FONGICIDE</u></b>				
<b>EN 1275</b> ( <i>C.albicans</i> )	2,5%	15 min.	16/10/2008	Laboratoire Rivadis
<b>EN 13697</b> cond. saleté ( <i>C.albicans</i> )	20%	15 min.	26/01/2016	LMH
<b>EN 13624</b> cond. saleté ( <i>C.albicans</i> )	20%	5 min.	07/05/2015	LMH
<b><u>MYCOBACTÉRICIDE</u></b>				
<b>EN 14348</b> cond. propreté ( <i>M.avium</i> )	50%	15 min.	14/11/2008	Blu Scientific
<b><u>VIRUCIDE</u></b>				
<b>EN 14476</b> (Rotavirus)	90%	5 min.	26/09/2008	Mikrolab GmbH
<b>HIV1</b>	100%	5 min.	10/10/1997	Institut Pasteur
<b>HBV</b>	0,25%	10 min.	24/06/1997	Institut Pasteur
<b>EN 14476</b> (Influenza A/H1N1)	80%	30 s.	P09ML928-3Si du 20/11/2009	Mikrolab GmbH

Les rapports d’études sont consultables en annexes.

## 7. RÈGLEMENTATION PRODUIT - CONDUITES D'URGENCE

### Règlementation produit

Le **PHAGO'SPRAY DM** est formulé conformément aux réglementations en vigueur au sein de l'Union Européenne et de la France relatives aux produits biocides.

### Conduites d'urgence

- ✓ En cas d'ingestion, rincer la bouche **ne pas faire vomir**, consulter un médecin.
- ✓ En cas de contact avec les yeux, laver abondamment à l'eau puis se rendre si nécessaire chez un médecin.
- ✓ Numéro national d'appel d'urgence ORFILA : 01 45 42 59 59
- ✓ Utiliser les biocides avec précautions. Avant toute utilisation, lire l'étiquette et les informations concernant le produit.
- ✓ La fiche de données de sécurité est à la disposition des utilisateurs et le site [www.quickfds.com](http://www.quickfds.com). Ce site vous permet ensuite d'être informé automatiquement par email de toute mise à jour des fiches de données de sécurité consultées.

## 8. COMPATIBILITÉS

- ✓ Caoutchoucs et plastiques : compatible avec les matériaux qui résistent à l'alcool éthylique. Sur les surfaces sensibles, procéder à un test de compatibilité sur un endroit peu visible ;
- ✓ Plexiglas : à valider selon le type de plexiglas ;
- ✓ Métaux ;
- ✓ Revêtements muraux BUFLON (mur bath, murs cythère et alto opéra) ;
- ✓ Mousses et revêtements ASKLE ;
- ✓ Gel-coats sanitaires d'Altor Industrie ;

## 9. INCOMPATIBILITÉS

- ✓ Ne pas mélanger aux aldéhydes ou pulvériser sur des surfaces préalablement traitées avec cette classe chimique (formation de bases de Schiff colorées en rouge)
- ✓ Ne pas mélanger avec un tensio-actif anionique

## 10. CONSERVATION

- ✓ Stockage dans les flacons d’origine fermés, à température ambiante, à l’abri de la chaleur et du gel.
- ✓ Péréemption : 3 ans à partir de la date de fabrication
- ✓ Eviter l’évaporation de l’alcool après ouverture, en maintenant le flacon fermé.
- ✓ Le numéro de lot et la date de péréemption sont imprimés sur le flacon et le bidon.

## 11. CONDITIONNEMENTS

Présentation	Code	Nombre d’unités par carton
Flacon de 750ml	60416	6 unités
Bidon de 5 litres	60414	2 unités

## 12. ANNEXES

## ATTESTATION D'EQUIVALENCE

Je soussigné, Olivier COTTRON, Pharmacien responsable du laboratoire PHAGOGENE atteste que les formule des produits :

**PHAGOSPRAY DM**

et

**ASPHENE SPRAY DE515**

et

**SPRAY DESINFECTANT HYDRO-ALCOOLIQUE DE515**

Ont une formule strictement identique.

Cette attestation est délivrée pour valoir ce que de droit.

NANTES, le 20/01/12



Olivier COTTRON  
Pharmacien Responsable





<b>LABORATOIRE RIVADIS</b>	Date : 08/08/08	Page : 2/4
<b>Fiche procès-verbal Norme NF EN 1040</b>	Réf : 51/F-090/G	

## PROCES-VERBAL D'ESSAI N° 2008/040

**ESSAI** : Détermination de l'activité bactéricide de base selon la norme NF EN 1040 (phase 1), (avril 2006)

Méthode par dilution-neutralisation

*Remarque : cet essai est inspiré de la méthodologie de la norme correspondante et ne pourra en aucun cas se substituer à un essai conforme à la norme réalisé par un laboratoire indépendant agréé.*

**PRODUIT** : asphène spray DE515

**FABRICANT** : LABORATOIRE RIVADIS

**PERIODE DES ESSAIS** : du 02/07/2008 au 04/07/2008

### **SIGNATAIRES** :

Alain LE BEC, Microbiologiste Laboratoire de Contrôle

Guillaume MACOUIN, Responsable Laboratoire de Contrôle

*Ce document diffusé commence à la page 2/2*

(N° procès verbal : 4 chiffres de l'année du début de l'essai / 3 chiffres chronologiques)



<b>LABORATOIRE RIVADIS</b>	Date : 08/08/08	Page : 3/4
<b>Fiche procès-verbal Norme NF EN 1040</b>	Réf : 51/F-090/G	

**I • IDENTIFICATION COMPLETE DE L'ECHANTILLON**

- ♦ Nom du produit : Asphène spray
- ♦ Numéro de lot ou identification : DE515 réf 805051
- ♦ Date de fabrication : du 05/05/2008, 10 kg
- ♦ Fabricant : LABORATOIRE RIVADIS
- ♦ Conditions de stockage : température ambiante au laboratoire de microbiologie
- ♦ Période d'analyse : du 02/07/08 au 04/07/08
- ♦ Aspect du produit et de ses dilutions : liquide limpide incolore

**II • CONDITIONS EXPERIMENTALES**

- ♦ Température d'essai : 20°C
- ♦ Temps de contact : 1 minute
- ♦ Diluant du produit utilisé lors des essais : eau osmosée
- ♦ Souches de microorganismes :
  - Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442
  - Staphylococcus aureus ATCC 6538

**III • VALIDATION DE LA METHODE DE NEUTRALISATION**

Souche de micro-organismes	Concentration en produit testée (%)	Nombre de cellules viables (UFC/ml)			
		Suspension bactérienne d'essai (N)	Suspension bactérienne (N <sub>v</sub> )	Témoin de toxicité du neutralisant (N <sub>x</sub> )	Essai de dilution-neutralisation (N <sub>y</sub> )
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	1,0	2.1 <sup>e</sup> 8	970	98	85
Staphylococcus aureus CIP ATCC 6538	1,0	1.11 <sup>e</sup> 8	545	59.5	60.5

La méthode de neutralisation est validée si :

- N est compris entre  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml et  $5 \times 10^8$  UFC/ml ;
- N<sub>v</sub> est compris entre  $6 \times 10^2$  UFC/ml et  $3 \times 10^3$  UFC/ml ;
- N<sub>x</sub> et N<sub>y</sub> sont supérieurs ou égaux à  $0,05 \cdot N_v$  ;

La méthode de neutralisation est validée dans les conditions décrites pour une concentration en produit de 1.0%V/V

**IV • RESULTATS DES ESSAIS**A) Exprimé en nombre de cellules viables (Na) par ml du mélange produit-microorganismes

Souche de micro-organismes	Temps de contact (min)	Concentration testée (%)		
		0.25 V/V	0.50V/V	1.00V/V
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	1	0	0	0
Staphylococcus aureus ATCC 6538	1	>3000	5	0

B) Exprimé en réduction du nombre de cellules viables.

Souche de micro-organismes	Temps de contact (min)	Concentration testée (%)		
		0.25 V/V	0.50 V/V	1.00 V/V
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	1	5	5	5
Staphylococcus aureus ATCC 6538	1	0	5	5

Sont bactéricides les concentrations pour lesquelles le nombre de cellules viables est réduit de  $10^5$  ou plus.**V • CONCLUSION**

Le produit ASPHENE SPRAY DE515 réf 805051 fabriqué le 05/05/2008 est bactéricide à 0,5 % V/V en 1 min de contact selon la norme AFNOR EN 1040

DATE ET VISA OPERATEUR / MICROBIOLOGISTE :

15 09 2008

DATE ET VISA RESPONSABLE LABORATOIRE DE CONTROLE :

16/10/2008

# BluScientific Test Data

## TEST REPORT EN 1276 : Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas — Test method and requirements (phase 2, step 1)

### Test Laboratory

### BluScientific Test Data

School of Life Sciences  
Glasgow Caledonian University  
GLASGOW  
G4 0BA

### Identification of sample

Name of the product  
**Batch No.**  
Manufacturer

**RIVADIS HYDROALCOHOLIC DISINFECTANT SPRAY**  
**805051-DE515**

LABORATOIRES RIVADIS  
79 100 THOUARS, FRANCE

Date of Delivery  
Storage conditions  
Product diluent  
Active substances

1 JULY 2008  
4°C and darkness  
Hard Water  
Not known

### Test Method and its validation

Method  
Neutralizer

Filtration-neutralization  
Lecithin 3g/l, Polysorbate 80 30g/l, sodium thiosulphate 5g/l, L-histidine 1g/l, phosphate buffer 0.0025mol/l, sterilized by autoclave

### Experimental Conditions

Period of analysis  
Product diluent used  
Product test concentrations  
Appearance product dilutions  
Contact time  
Test temperature  
Interfering substance  
Stability of mixture  
Temperature of incubation  
Identification of strains

24 - 25 JULY 2008  
Sterile synthetic hard water  
80% V/V  
Clear  
 $t = 15 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$   
 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$   
0.3 g/l bovine serum albumin  
No precipitation  
 $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$   
*Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus hirae* ATCC 10541

### Conclusion

According to testing carried out under conditions specified in EN 1276, **RIVADIS HYDROALCOHOLIC DISINFECTANT SPRAY Batch No. 805051-DE515** possesses bactericidal activity after 15 minutes at 20°C under CLEAN conditions (0.3 g/l bovine serum albumin) for referenced strains *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 AND *Enterococcus hirae* ATCC 10541.

Signed



Dr Chris Woodall  
Director, BluScientific Test Data, 31 July 2008

School of Life Sciences, Glasgow Caledonian University, Glasgow G4 0BA, Scotland, UK

T: +44 (0) 141 331 8245 M: +44 (0) 7989 96 48 11 F: +44 (0) 141 331 3208

E: info@bluscientific.com W: www.bluscientific.com

BluScientific Test Data is based in the School of Life Sciences at Glasgow Caledonian University  
Glasgow Caledonian University is a registered Scottish charity, number SC021474



## EN1276: RIVADIS HYDROALCOHOLIC DISINFECTANT SPRAY Batch No. 805051-DE515

Test organisms		Validation test					
Bacterial Suspension	Experimental conditions	Neutralizer toxicity control or filtration control	Dilution-neutralization control or filtration test control	Bacterial test Suspension	Exposure time (mins)	Test procedure at concentration % (V/V)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Vc:65; 69	Vc: 67; 77	Vc: 63; 51	10 <sup>5</sup> : 265; 218 10 <sup>7</sup> : 37; 31 N: 2.4 x 10 <sup>8</sup>	15	80.0	
	Nv:7.8 x 10 <sup>2</sup> A: 6.7 x 10 <sup>1</sup>	B: 7.2 x 10 <sup>1</sup>	C: 5.7 x 10 <sup>1</sup>				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	Vc:292; 256	Vc:202; 168	Vc: 199; 264	10 <sup>5</sup> >300;>300 10 <sup>7</sup> : 46; 47 N: 4.7 x 10 <sup>8</sup>	15	0; 0 <1.5 x 10 <sup>2</sup> >10 <sup>5</sup>	
	Nv:2.7 x 10 <sup>3</sup> A: 2.5 x 10 <sup>2</sup>	B: 1.8 x 10 <sup>2</sup>	C: 2.3 x 10 <sup>2</sup>				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Vc:206; 187	Vc:190; 183	Vc: 223; 184	10 <sup>5</sup> >300;>300 10 <sup>7</sup> : 52; 42 N: 4.7 x 10 <sup>8</sup>	15	0; 0 <1.5 x 10 <sup>2</sup> >10 <sup>5</sup>	
	Nv:1.4x 10 <sup>3</sup> A: 1.9 x 10 <sup>2</sup>	B: 1.8 x 10 <sup>2</sup>	C: 2.0 x 10 <sup>2</sup>				
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	Vc:137; 162	Vc:147; 152	Vc: 165; 179	10 <sup>5</sup> : 188; 184 10 <sup>7</sup> : 12; 15 N: 1.8 x 10 <sup>8</sup>	15	0; 0 <1.5 x 10 <sup>2</sup> >10 <sup>5</sup>	
	Nv:1.8 x 10 <sup>3</sup> A: 1.5 x 10 <sup>2</sup>	B: 1.5 x 10 <sup>2</sup>	C: 1.7 x 10 <sup>2</sup>				

Vc = viable count

N = number of cfu/ml of the bacterial test suspension

Nv = number of cfu/ml in the bacterial suspension

R = reduction in viability

Na = number of cfu/ml in the test mixture

A = number of cfu/ml of the experimental conditions validation

B = number of cfu/ml of the neutralizer toxicity validation or of the filtration validation

C = the number of cfu/ml of the dilution-neutralization validation or the membrane filtration test validation

# BluScientific Test Data

## Test Report EN 13727. Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants for instruments used in the medical area — Test method and requirements (phase 2, step 1)

### Test Laboratory

### BluScientific Test Data

School of Life Sciences  
Glasgow Caledonian University  
GLASGOW  
G4 0BA

### Identification of sample

Name of the product  
**Batch Number**  
Manufacturer

### RIVADIS HYDROALCOHOLIC DISINFECTANT SPRAY

**805051-DE515**  
LABORATOIRES RIVADIS  
79 100 THOUARS, FRANCE

Date of Delivery  
Storage conditions  
Active substances

1 JULY 2008  
4°C and darkness  
Not known

### Test Method and its validation

Method  
Neutralizer

Filtration-neutralization  
Lecithin 3g/l, Polysorbate 80 30g/l, sodium thiosulphate  
5g/l, L-histidine 1g/l, phosphate buffer 0.0025mol/l,  
sterilized by autoclave

### Experimental Conditions

Period of analysis  
Product diluent used  
Product test concentrations  
Appearance product dilutions  
Contact time  
Test temperature  
Interfering substance  
Stability of mixture  
Temperature of incubation  
Identification of strains

8–10 SEPTEMBER 2008  
Sterile, synthetic hard water  
10.0% V/V; 50.0% V/V; 80.0% V/V  
Clear  
**t = 5 min ± 10 s**  
20°C ± 1°C  
**3.0 g/l bovine albumin + 3% sheep erythrocytes**  
No precipitation  
37°C ± 1°C  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442  
*Staphylococcus aureus* ATCC 6538  
*Enterococcus hirae* ATCC 10541

### Conclusion

According to testing carried out under conditions specified in EN 13727, **RIVADIS HYDROALCOHOLIC DISINFECTANT SPRAY** possesses bactericidal activity after **5 minutes** at 20°C under **DIRTY** conditions (3.0 g/L bovine serum albumin + 3% sheep erythrocytes) for referenced strains *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Enterococcus hirae* ATCC 10541.

Signed



Dr Chris Woodall, Director  
BluScientific Test Data  
22 SEPTEMBER 2008

School of Life Sciences, Glasgow Caledonian University, Glasgow G4 0BA, Scotland, UK

T: +44 (0) 141 331 8245 M: +44 (0) 7989 96 48 11 F: +44 (0) 141 331 3208

E: info@bluscientific.com W: www.bluscientific.com

BluScientific Test Data is based in the School of Life Sciences at Glasgow Caledonian University  
Glasgow Caledonian University is a registered Scottish charity, number SC021474



## EN13727 2003. HYDROALCOHOLIC DISINFECTANT SPRAY, RIVADIS

Test organisms	Validation test				Bacterial test	Test procedure at concentration % (V/V)			
	Bacterial Suspension	Experimental conditions	Neutralizer toxicity control or filtration control	Dilution-neutralization control or filtration test control		10	50	80	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vc: 96; 127	Vc: 198; 194	Vc: 192; 168	Vc: 175; 154	10 <sup>-6</sup> ; 179; 194 10 <sup>-7</sup> ; 12; 18 N: 1.8 x 10 <sup>8</sup>	>300; >300 >300 <10 <sup>5</sup>	0; 0 <1.5 x 10 <sup>2</sup> >10 <sup>5</sup>	0; 0 <1.5 x 10 <sup>2</sup> >10 <sup>5</sup>	0; 0 <1.5 x 10 <sup>2</sup> >10 <sup>5</sup>
ATCC 15442	Nv: 1 x 10 <sup>3</sup> Vc: 143; 138	A: 1.9 x 10 <sup>2</sup> Vc: 131; 171	B: 1.8 x 10 <sup>2</sup> Vc: 137; 175	C: 1.6 x 10 <sup>2</sup> Vc: 170; 179	10 <sup>-6</sup> ; 261; 246 10 <sup>-7</sup> ; 20; 12 N: 2.5 x 10 <sup>8</sup>	0; 0 <1.5 x 10 <sup>2</sup> >10 <sup>5</sup>	0; 0 <1.5 x 10 <sup>2</sup> >10 <sup>5</sup>	0; 0 <1.5 x 10 <sup>2</sup> >10 <sup>5</sup>	0; 0 <1.5 x 10 <sup>2</sup> >10 <sup>5</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nv: 1.4 x 10 <sup>3</sup> Vc: 104; 104	A: 1.5 x 10 <sup>2</sup> Vc: 122/111	B: 1.5 x 10 <sup>2</sup> Vc: 108; 101	C: 1.7 x 10 <sup>2</sup> Vc: 120; 132	10 <sup>-6</sup> ; 169; 189 10 <sup>-7</sup> ; 20; 28 N: 1.8 x 10 <sup>8</sup>	0; 0 <1.5 x 10 <sup>2</sup> >10 <sup>5</sup>	0; 0 <1.5 x 10 <sup>2</sup> >10 <sup>5</sup>	0; 0 <1.5 x 10 <sup>2</sup> >10 <sup>5</sup>	0; 0 <1.5 x 10 <sup>2</sup> >10 <sup>5</sup>
ATCC 6538									
<i>Enterococcus hirae</i>									
ATCC 10541	Nv: 1.0 x 10 <sup>3</sup>	A: 1.1 x 10 <sup>2</sup>	B: 1.0 x 10 <sup>2</sup>	C: 1.2 x 10 <sup>2</sup>					

Vc = viable count

N = number of cfu/ml of the bacterial test suspension

Nv = number of cfu/ml in the bacterial suspension

R = reduction in viability

Na = number of cfu/ml in the test mixture

A = number of cfu/ml of the experimental conditions validation

B = number of cfu/ml of the neutralizer toxicity validation or of the filtration validation

C = the number of cfu/ml of the dilution-neutralization validation or the membrane filtration test validation

# BluScientific Test Data

## Test Report EN13697. Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas — Test method and requirements without mechanical action (phase 2/step 2).

### Test Laboratory

### BluScientific Test Data

School of Life Sciences  
Glasgow Caledonian University  
GLASGOW  
G4 0BA

### Identification of sample

Name of the product

**RIVADIS HYDROALCOHOLIC DISINFECTANT  
SPRAY**

Batch No.

**805051-DE515**

Manufacturer

LABORATOIRES RIVADIS  
79 100 THOUARS, FRANCE

Date of Delivery

1 JULY 2008

Storage conditions

4°C and darkness

Active substances

Not known

### Test Method and its validation

Neutralizer

Lecithin 3g/l, Polysorbate 80 30g/l, sodium thiosulphate 5g/l, L-histidine 1g/l, phosphate buffer 0.0025mol/l, sterilized by autoclave

### Experimental Conditions

Period of analysis

5 – 7 AUGUST 2008

Product diluent used

Sterile, synthetic, hard water

Product test concentrations

10% V/V; 50% V/V; 100% V/V

Appearance product dilutions

Clear

Contact time

$t = 5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$

Test temperature

$20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$

Interfering substance

**0.3 g/l bovine albumin**

Stability of mixture

No precipitation

Temperature of incubation

$37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$

Identification of strains

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442;  
*Escherichia coli* ATCC 10536;  
*Staphylococcus aureus* ATCC 6538;  
*Enterococcus hirae* ATCC 10541

### Conclusion

According to testing carried out under conditions specified in EN13697:2001, **RIVADIS HYDROALCOHOLIC DISINFECTANT SPRAY BATCH NO. 805051-DE515** possesses bactericidal activity after 5 minutes at 20°C under **CLEAN** conditions (0.3 g/l bovine albumin) for referenced strains *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Enterococcus hirae* ATCC 10541.

Signed



Dr Chris Woodall, Director,  
BluScientific Test Data, 24 AUGUST 2008.

School of Life Sciences, Glasgow Caledonian University, Glasgow G4 0BA, Scotland, UK

T: +44 (0) 141 331 8245 M: +44 (0) 7989 96 48 11 F: +44 (0) 141 331 3208

E: [info@bluscientific.com](mailto:info@bluscientific.com) W: [www.bluscientific.com](http://www.bluscientific.com)

BluScientific Test Data is based in the School of Life Sciences at Glasgow Caledonian University  
Glasgow Caledonian University is a registered Scottish charity, number SC021474





# BluScientific Test Data

## EN 13697 2001: CLEAN CONDITIONS. RIVADIS HYDROALCOHOLIC DISINFECTANT SPRAY. BATCH: 805051-DE515 LABORATOIRES RIVADIS

Test organisms	Bacterial test suspension	Validation test			Water control	Test procedure at concentrations % V/V of the working concentration		
		NT	NC	NC		10	50	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 <sup>-6</sup> : 264; 368 10 <sup>-7</sup> : 39;41 N: 7.21	10 <sup>-3</sup> : 10; 15 10 <sup>-4</sup> : 0; 0 NT: 5.11	10 <sup>-3</sup> : 35; 42 10 <sup>-4</sup> : 4; 6 NC: 5.60	NC	10 <sup>0</sup> : 0; 0 10 <sup>-2</sup> : 0; 0 Nd: <0.1 Nts: 0 ME: 6.04	10 <sup>0</sup> : 0; 0 10 <sup>-2</sup> : 0; 0 Nd: <0.1 Nts: 0 ME: 6.04	10 <sup>0</sup> : 0; 0 10 <sup>-2</sup> : 0; 0 Nd: <0.1 Nts: 0 ME: 6.04	
ATCC 15442								
<i>Escherichia coli</i>	10 <sup>-6</sup> : >300; >300 10 <sup>-7</sup> : 55; 53 N: 7.43	10 <sup>-3</sup> : 90; 85 10 <sup>-5</sup> : 0; 0 NT: 5.94	10 <sup>-3</sup> : 191; 160 10 <sup>-5</sup> : 23; 28 NC: 6.26	10 <sup>-3</sup> : >300; >300 10 <sup>-4</sup> : -; 10 <sup>-5</sup> : 27; 30 Nc: 7.45 Nts: >300	10 <sup>0</sup> : >300; >300 10 <sup>-2</sup> : 28; 28 Nd: 4.45 Nts: 0 ME: 4.30	10 <sup>0</sup> : 129; 152 10 <sup>-2</sup> : 1; 0 Nd: 3.15 Nts: 0 ME: 5.55	10 <sup>0</sup> : 8; 8 10 <sup>-2</sup> : 0; 0 Nd: 1.90 Nts: 0 ME: 5.55	
ATCC 10536								
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 <sup>-6</sup> : 264; 320 10 <sup>-7</sup> : 33; 37 N: 7.17	10 <sup>-3</sup> : >300; >300 10 <sup>-5</sup> : 13; 11 NT: 7.08	10 <sup>-4</sup> : >300; >300 10 <sup>-5</sup> : 10,12 NC: 7.04	10 <sup>-3</sup> : >300; >300 10 <sup>-4</sup> : -; 10 <sup>-5</sup> : 8; 14 Nc: 7.04 Nts: >300	10 <sup>0</sup> : 0; 0 10 <sup>-2</sup> : 0; 0 Nd: <0.1 Nts: 0 ME: 6.94	10 <sup>0</sup> : 22; 17 10 <sup>-2</sup> : 0; 0 Nd: 2.29 Nts: 0 ME: 4.75	10 <sup>0</sup> : 0; 0 10 <sup>-2</sup> : 0; 0 Nd: <0.1 Nts: 0 ME: 6.94	
ATCC 6538								
<i>Enterococcus hirae</i>	10 <sup>-5</sup> : 236; 260 10 <sup>-7</sup> : 19; 28 N: 7.09	10 <sup>-3</sup> : 320; 232 10 <sup>-5</sup> : 6; 9 NT: 6.74	10 <sup>-4</sup> : >300; >300 10 <sup>-5</sup> : 6; 8 NC: 6.84	10 <sup>-3</sup> : >300; >300 10 <sup>-4</sup> : -; 10 <sup>-5</sup> : 6; 4 Nc: 6.70 Nts: >300	10 <sup>0</sup> : 5; 8 10 <sup>-2</sup> : 0; 0 Nd: 1.81 Nts: 0 ME: 4.89	10 <sup>0</sup> : 0; 0 10 <sup>-2</sup> : 0; 0 Nd: <0.1 Nts: 0 ME: 6.60	10 <sup>0</sup> : 0; 0 10 <sup>-2</sup> : 0; 0 Nd: <0.1 Nts: 0 ME: 6.60	
ATCC 10541								

# BluScientific Test Data

## Table Definitions

NT -	Log <sub>10</sub> number of colony forming units (cfu) per test surface of the neutralisation test
NC -	Log <sub>10</sub> number of cfu per test surface of the neutralisation control
N <sub>c</sub> -	Log <sub>10</sub> number of cfu per test surface of the water control
N -	Log <sub>10</sub> number of cfu per 50ul of the test suspension
N <sub>ts</sub> -	Less than 100cfu/ml for active concentrations
N <sub>d</sub> -	Log <sub>10</sub> number of cfu per test surface of the disinfectant test
ME -	Microbiocidal Effect

School of Life Sciences, Glasgow Caledonian University, Glasgow G4 0BA, Scotland, UK

T: +44 (0) 141 331 8245 M: +44 (0) 7989 96 48 11 F: +44 (0) 141 331 3208

E: [info@bluscientific.com](mailto:info@bluscientific.com) W: [www.bluscientific.com](http://www.bluscientific.com)

BluScientific Test Data is based in the School of Life Sciences at Glasgow Caledonian University  
Glasgow Caledonian University is a registered Scottish charity, number SC021474



# BluScientific Test Data

**Test Report EN13697. *Salmonella typhimurium* NCTC 74 (ATCC 13311)  
Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas — Test method and requirements without mechanical action (phase 2/step 2).**

## Test Laboratory

## BluScientific Test Data

School of Life Sciences  
Glasgow Caledonian University  
GLASGOW  
G4 0BA

## Identification of sample

Name of the product

**RIVADIS HYDROALCOHOLIC DISINFECTANT  
SPRAY**

Batch No.

**805051-DE515**

Manufacturer

LABORATOIRES RIVADIS  
79 100 THOUARS, FRANCE

Date of Delivery

1 JULY 2008

Storage conditions

4°C and darkness

Product diluent

Hard Water

Active substances

Not known

## Test Method and its validation

Method

Dilution-neutralization

Neutralizer

Lecithin 3g/l, Polysorbate 80 30g/l, sodium thiosulphate 5g/l, L-histidine 1g/l, phosphate buffer 0.0025mol/l, sterilized by autoclave

## Experimental Conditions

Period of analysis

5 – 7 AUGUST 2008

Product diluent used

Sterile, synthetic hard water

Product test concentrations

10% V/V; 50% V/V; 100% V/V

Appearance product dilutions

Clear

Contact time

t = 5 min ± 10 s

Test temperature

20°C ± 1°C

Interfering substance

1% V/V Sterile **reconstituted milk**

Stability of mixture

No precipitation

Temperature of incubation

37°C ± 1°C

Identification of strains

*Salmonella typhimurium* NCTC 74 (ATCC 13311)

## Conclusion

According to testing carried out under conditions specified in EN13697:2001, **RIVADIS HYDROALCOHOLIC DISINFECTANT SPRAY BATCH NO. 805051-DE515** possesses bactericidal activity after 5 minutes at 20°C using **1% V/V STERILE RECONSTITUTED MILK** as an interfering substance, for referenced strain *Salmonella typhimurium* NCTC 74 (ATCC 13311).

Signed



Dr Chris Woodall, Director

BluScientific Test Data

24 AUGUST 2008

School of Life Sciences, Glasgow Caledonian University, Glasgow G4 0BA, Scotland, UK

T: +44 (0) 141 331 8245 M: +44 (0) 7989 96 48 11 F: +44 (0) 141 331 3208

E: info@bluscientific.com W: www.bluscientific.com

BluScientific Test Data is based in the School of Life Sciences at Glasgow Caledonian University  
Glasgow Caledonian University is a registered Scottish charity, number SC021474



# BluScientific Test Data

**EN 13697 2001: 1% V/V RECONSTITUTED MILK INTERFERING SUBSTANCE. RIVADIS HYDROALCOHOLIC DISINFECTANT SPRAY.  
BATCH: 805051-DE515 LABORATOIRES RIVADIS**

Test organisms	Bacterial test suspension	Validation test		Water control	Test procedure at concentrations % V/V of the working concentration		
		NT	NC		10	50	100
<b><i>Salmonella typhimurium</i></b>	10 <sup>-6</sup> : >300;>300 10 <sup>-7</sup> : 59;40 N: 7.39	10 <sup>-3</sup> : 44; 34 10 <sup>-5</sup> : 0; 0 NT: 5.59	10 <sup>-3</sup> : 33 ; 28 10 <sup>-5</sup> : 0; 0 NC: 5.48	Nc 10 <sup>-3</sup> : 30; 34 10 <sup>-4</sup> : -; - 10 <sup>-5</sup> : -; - Nc: 5.80 Nts: >300	10 <sup>0</sup> : 0; 0 10 <sup>-2</sup> : 0; 0 Nd: <0.1 Nts: 0 ME: 5.70	10 <sup>0</sup> : 0; 0 10 <sup>-2</sup> : 0; 0 Nd: <0.1 Nts: 0 ME: 5.70	10 <sup>0</sup> : 0; 0 10 <sup>-2</sup> : 0; 0 Nd: <0.1 Nts: 0 ME: 5.70
<b>NCTC 74 (ATCC 13311)</b>							

- NT - Log<sub>10</sub> number of colony forming units (cfu) per test surface of the neutralisation test
- NC - Log<sub>10</sub> number of cfu per test surface of the neutralisation control
- Nc - Log<sub>10</sub> number of cfu per test surface of the water control
- N - Log<sub>10</sub> number of cfu per 50ul of the test suspension
- Nts - Less than 100cfu/ml for active concentrations
- Nd - Log<sub>10</sub> number of cfu per test surface of the disinfectant test
- ME - Microbiocidal Effect

# BluScientific Test Data

## Test Report BS EN 14348: 2005 (*Mycobacterium avium*) Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical disinfectants in the medical area including instrument disinfectants— Test method and requirements (phase 2, step 1)

### Test Laboratory

### BluScientific Test Data

School of Life Sciences  
Glasgow Caledonian University  
GLASGOW  
G4 0BA

### Identification of sample

Name of the product  
**Batch Number**  
Manufacturer  
Date of Delivery  
Project code  
Storage conditions  
Active substances

### HYDROALCOHOLIC DISINFECTANT SPRAY

**805051-DE515**  
LABORATOIRES RIVADIS, 79100, THOUARS, FRANCE  
1 July 2008  
BS-RDS-002  
4°C and darkness  
Not known

### Test Method and its validation

Method  
Neutralizer

Dilution-neutralization  
Lecithin 3g/l, Polysorbate 80 30g/l, sodium thiosulphate 5g/l, L-histidine 1g/l, phosphate buffer 0.0025mol/l, sterilized by autoclave

### Experimental Conditions

Period of analysis  
Product diluent used  
Product test concentrations  
Appearance product dilutions  
Contact time  
Test temperature  
Interfering substance  
Stability of mixture  
Temperature of incubation  
Identification of strain

22 October to 11 November 2008  
Sterile hard water  
80% V/V; 50% V/V; 20% V/V  
Colourless, clear product solution  
 $t = 15 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$   
 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$   
0.3 g/l bovine albumin  
Precipitate absent throughout the test  
 $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$   
*Mycobacterium Avium* ATCC 15769

### Conclusion

Following the EN 14348 (2005) protocol *Mycobacterium avium*, **HYDROALCOHOLIC DISINFECTANT SPRAY**, batch number **805051-DE515**, possesses mycobactericidal activity in 15 minutes at 20°C under **CLEAN** conditions (0.3 g/l bovine albumin) for reference strain *Mycobacterium Avium* ATCC 15769.

Signed



Dr Chris Woodall, Director  
BluScientific Test Data  
Glasgow, UK, 14 November 2008

School of Life Sciences, Glasgow Caledonian University, Glasgow G4 0BA, Scotland, UK

T: +44 (0) 141 331 8245 M: +44 (0) 7989 96 48 11 F: +44 (0) 141 331 3208

E: info@bluscientific.com W: www.bluscientific.com

BluScientific Test Data is based in the School of Life Sciences at Glasgow Caledonian University  
Glasgow Caledonian University is a registered Scottish charity, number SC021474



# BluScientific Test Data

## RESULTS

**TABLE 1**

	Number of cells per ml in the mycobacterial suspensions	Number of cells per ml in the test mixtures at the beginning of the contact time (time 0)	Number of survivors per ml in the test mixtures at the end of the contact-time.
Test	$N = 3.4 \times 10^9$	$N_0 = 3.4 \times 10^8$	$N_a$ (SEE TABLE 2)
Controls	$N_v = 5.2 \times 10^2$	$N_{v0} = 5.2 \times 10^1$	A = $2.5 \times 10^1$ B = $5.3 \times 10^1$ C = $5.2 \times 10^1$

- a)  $N$  is between  $1,5 \times 10^9$  cfu/ml and  $5,0 \times 10^9$  cfu/ml ( $9,17 \leq \lg N \leq 9,70$ ) and  $N_0$  is between  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml and  $5,0 \times 10^8$  cfu/ml ( $8,17 \leq \lg N_0 \leq 8,70$ )  
 b)  $N_{v0}$  is between 30 and 160 cfu/ml ( $3,0 \times 10^1$  and  $1,6 \times 10^2$ ) and  $N_v$  is between  $3,0 \times 10^2$  and  $1,6 \times 10^3$  cfu/ml  
 c)  $A, B, C$  are equal to or greater than  $0,5 \times N_{v0}$

**TABLE 2**

CONCENTRATION	$N_a$	$N_0/N_a$	Log Reduction (R)
80% V/V	$<1.4 \times 10^4$	$>2.4 \times 10^4$	4.4
50% V/V	$1.8 \times 10^4$	$1.9 \times 10^4$	4.3
20% V/V	$1.1 \times 10^6$	$3.1 \times 10^2$	2.5



<b>LABORATOIRE RIVADIS</b>	Date : 08/08/08	Page : 2/4
<b>Fiche procès-verbal Norme NF EN 1275</b>	Réf : 51/F-091/H	

## PROCES-VERBAL D'ESSAI N° 2008/041

**ESSAI** : Norme NF EN 1275 : antiseptiques et désinfectants chimiques – activité fongicide de base - méthode d'essai et prescription (phase 1), (avril 2006).

Méthode par dilution-neutralisation.

*Remarque : cet essai est inspiré de la méthodologie de la norme correspondante et ne pourra en aucun cas se substituer à un essai conforme à la norme réalisé par un laboratoire indépendant agréé.*

**PRODUIT** : asphène spray DE515

**FABRICANT** : LABORATOIRE RIVADIS

**PERIODE DES ESSAIS** : le 08/07/2008

### **SIGNATAIRES** :

Alain LE BEC, Microbiologiste Laboratoire de Contrôle

Guillaume MACOUIN, Responsable Laboratoire de Contrôle

*Ce document diffusé commence à la page 2/2*

(N° procès verbal : 4 chiffres de l'année du début de l'essai / 3 chiffres chronologiques)



<b>LABORATOIRE RIVADIS</b>	Date : 08/08/08	Page : 3/4
Fiche procès-verbal Norme NF EN 1275	Réf : 51/F-091/H	

**I · IDENTIFICATION COMPLETE DE L'ECHANTILLON**

- Nom du produit : asphène spray
- Numéro de lot ou identification : DE515, réf 805051
- Date de fabrication : 05/05/2008, 10 kg
- Fabricant : LABORATOIRE RIVADIS
- Conditions de stockage : à température ambiante au labo
- Période d'analyse : le 08/07/2008
- Aspect du produit et de ses dilutions : liquide limpide incolore

**II · CONDITIONS EXPERIMENTALES**

- Temps de contact : 15 min
- Température d'essai : 20°C
- Diluant du produit utilisé lors des essais : eau osmosée
- Souche fongicide :

*Candida albicans*      ATCC 10231      incubation : 2 fois 48h à 30°C sur GEM  
*Aspergillus niger*      ATCC 16404      incubation :

- Neutralisant : N5, neutralisant interne du 03/07/2008

**III · VALIDATION DE LA METHODE DE NEUTRALISATION**

Souche de micro-organismes	Concentration en produit testée (%)	Nombre de cellules viables (UFC/ml)			
		Suspension fongicide d'essai (N)	Suspension fongicide (N <sub>v</sub> )	Témoin de toxicité du neutralisant (N <sub>x</sub> )	Essai de dilution-neutralisation (N <sub>y</sub> )
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	5 % V/V	2.13 <sup>e</sup> 7	995	104	86,5
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404					

La méthode de neutralisation est validée si :

- N est compris entre  $1.5 \times 10^7$  UFC/ml et  $5 \times 10^7$  UFC/ml ;
- N<sub>v</sub> est compris entre  $6 \times 10^2$  UFC/ml et  $1,5 \times 10^3$  UFC/ml ;
- N<sub>x</sub> et N<sub>y</sub> sont supérieurs ou égaux à 0,5 fois N<sub>v</sub>.

La méthode de neutralisation est validée dans les conditions décrites pour une concentration en produit de 5,0 % V/V.



**LABORATOIRE RIVADIS**

Date : 08/08/08

Page : 4/4

Fiche procès-verbal Norme NF EN 1275

Réf : 51/F-091/H

**IV - RESULTATS DES ESSAIS**A) Exprimé en nombre de cellules viables (Na) par ml du mélange produit-microorganismes

Souche de micro-organismes	Temps de contact (min)	Concentration testée (%)		
		1,0 % V/V	2,5 % V/V	5,0 % V/V
Candida albicans ATCC 10231	15 min	112,5	0	0
Aspergillus niger ATCC 16404				

B) Exprimé en réduction du nombre de cellules viables.

Souche de micro-organismes	Temps de contact (min)	Concentration testée (%)		
		1,0 % V/V	2,5 % V/V	5,0 % V/V
Candida albicans ATCC 10231	15 min	3,3	>4	>4
Aspergillus niger ATCC 16404				

Sont fongicides les concentrations pour lesquelles le nombre de cellules viables est réduit de  $10^4$  ou plus.

**V • CONCLUSION**

Le produit asphène DE515 réf 805051 est levuricide en 15 min de contact à 20°C à la concentration de 2,5 % V/V vis-à-vis de la souche de candida albicans ATCC 10231 selon la méthodologie de la norme AFNOR EN 1275.

DATE ET VISA OPERATEUR / MICROBIOLOGISTE :

16 09 2008

DATE ET VISA RESPONSABLE LABORATOIRE DE CONTROLE :

16/10/2008

**RAPPORT D'ESSAI**  
**N° 3590-1**

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

Imprimé le : 07/05/15  
Date de 1<sup>ère</sup> impression : 07/05/15  
Page 1 sur 5

**TEST D'EFFICACITE LEVURICIDE**  
**SELON LA NORME NF EN 13624 (Novembre 2013)**  
**1300**  
**Application = Désinfection de surface**  
(Méthode par dilution/neutralisation)

***DESTINATAIRE : CHRISTEYNS FRANCE***

**I- IDENTIFICATION DU DONNEUR D'ORDRE**

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

**II- IDENTIFICATION DE L'ECHANTILLON**

- Nom du produit : **1300**
- Numéro de lot : 739438
- Fabricant : CHRISTEYNS FRANCE
- Date de fabrication : 02/03/15
- Date de péremption : 02/03/18
- Date de réception au laboratoire : 06/03/15
- Aspect du produit : 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° 3590-1

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

Imprimé le : 07/05/15  
Date de 1<sup>ère</sup> impression : 07/05/15  
Page 2 sur 5

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

Neutralisant : 3% Polysorbate 80 ; 3% Saponine ; 0,3% Lécithine d'œuf ; 0,1% L-Histidine ; 0,5% Thiosulfate de sodium (stérilisé à 121°C pendant 20 minutes).

### IV- CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Période d'analyse : du 22/04/15 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%
- Technique d'essai : dilution/neutralisation
- Aspect des dilutions : Limpides
- Stabilité du mélange substance interférente/dilutions du produit/suspension microbienne : formation de flocculats et de précipités pour les 3 concentrations testées
- Temps de contact : 5 minutes (+/-10 secondes)
- Température d'essai : 20°C (+/-1°C)
- Substance interférente : 3 g/l d'albumine bovine et 3 ml d'érythrocytes de mouton (conditions de saleté)
- Température d'incubation : 30°C (+/-1°C)
- Identification de la souche utilisée :  
*Candida albicans* DSM 1386

# RAPPORT D'ESSAI

## N° 3590-1

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

Imprimé le : 07/05/15  
Date de 1<sup>ère</sup> impression : 07/05/15  
Page 3 sur 5

### V- RESULTATS D'ESSAI

*V<sub>c</sub> : nombre de colonies comptées sur les boîtes,*

*N<sub>i</sub> : nombre d'UFC / ml dans la suspension microbienne d'essai,*

*N<sub>0</sub> : nombre de cellules par ml dans le mélange d'essai au début du temps de contact, il représente un dixième de N<sub>i</sub>,*

*N<sub>v</sub> : nombre de cellules par ml de la suspension microbienne de validation,*

*N<sub>v0</sub> : nombre de cellules par ml dans les mélanges A, B et C au début du temps de contact. Il représente un dixième de N<sub>v</sub>,*

*N<sub>vB</sub> : 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 N<sub>v</sub>,*

*N<sub>a</sub> : 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 ( $R=N_0/N_a$ ) exprimé en logarithme*

# RAPPORT D'ESSAI

## N° 3590-1

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

Imprimé le : 07/05/15  
 Date de 1<sup>ère</sup> impression : 07/05/15  
 Page 4 sur 5

### 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)
<i>Candida albicans</i> DSM 1386 Lot 534	10 <sup>-5</sup> : Vc1 : 241 Vc2 : 233	Vc1 : 61 Vc2 : 58	Vc1 : 41 Vc2 : 52	Vc1 : 38 Vc2 : 41	Vc1 : 43 Vc2 : 54	Vc1 : 35 Vc2 : 38
	10 <sup>-6</sup> : Vc1 : 31 Vc2 : 32	(dilution 10 <sup>-1</sup> )	(dilution 10 <sup>-3</sup> )			
	N= 2,44.10 <sup>7</sup> N <sub>0</sub> = 2,44.10 <sup>6</sup> Log N <sub>0</sub> =6,39	Nv= 595 Nv <sub>0</sub> = 60	Nv <sub>B</sub> = 4,65.10 <sup>4</sup>	A= 40	B= 49	C=37

L'essai est validé si :

$N$  est compris entre 1,5.10<sup>7</sup> et 5.10<sup>7</sup> UFC/ml (7,17 ≤ lg N ≤ 7,70)

$N_0$  est compris entre 1,5.10<sup>6</sup> et 5.10<sup>6</sup> 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)

$N_{VB}$  est compris entre 3,0.10<sup>4</sup> et 1,6.10<sup>5</sup>

A, B et C sont supérieurs ou égaux à 0,5xN<sub>V0</sub>

B (dilution-neutralisation) est égal ou supérieur à 0,0005 x N<sub>VB</sub>

Le quotient des dénombrements obtenus par moyenne pondérée est compris entre 5 et 15

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

**RAPPORT D'ESSAI**  
**N° 3590-1**

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

Imprimé le : 07/05/15  
Date de 1<sup>ère</sup> impression : 07/05/15  
Page 5 sur 5

**VI- CONCLUSION**

Selon la méthodologie de la norme NF EN 13624 (Novembre 2013), le lot 739438 du produit 1300 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 3 g/l et d'érythrocytes de mouton à 3 ml/l (conditions de saleté) - mélange hétérogène en présence de la suspension fongique (voir Note ci-dessous),

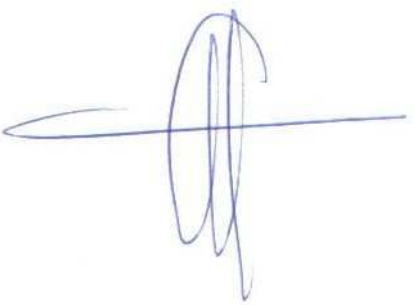

présente une réduction logarithmique supérieure à 4,24 lorsqu'il est dilué à 20%, 40% et 80% (V/V) vis-à-vis de la souche *Candida albicans* DSM 1386.

Note:

La formation d'un flocculat et précipité a été observée dans les mélanges d'essai aux 3 concentrations testées de 20%, 40% et 80%.

**VII-SIGNATURES**

Fait à DINARD, le

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

# RAPPORT D'ESSAI

## 3818-1

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

Imprimé le : 26/01/16  
Date de 1<sup>ère</sup> impression : 26/01/16  
Page 1 sur 5

<p><b>Test d'efficacité levuricide selon la norme NF EN 13697 (Juin 2015) <u>1300</u></b></p>
---

***DESTINATAIRE : CHISTEYNS 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 : **1300**
- Numéro de lot : 830485
- Fabricant : **CHRISTEYNS FRANCE**
- Date de fabrication : 12/01/15
- Date de péremption : 12/01/19
- Date de réception au laboratoire : 15/01/16
- Aspect du produit : produit liquide limpide incolore
- Conditions de stockage : à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Diluant du produit recommandé par le fabricant : eau du réseau
- Matière(s) active(s) : Non communiquées

# RAPPORT D'ESSAI

## 3818-1

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

Imprimé le : 26/01/16  
Date de 1<sup>ère</sup> impression : 26/01/16  
Page 2 sur 5

### III- METHODE D'ESSAI

Norme NF EN 13697 (Juin 2015)

Antiseptiques et désinfectants :

Essai quantitatif de surface non-poreuse pour l'évaluation de l'activité bactéricide et/ou fongicide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité.

Méthode d'essai sans action mécanique et prescriptions (phase 2, étape 2).

Evaluation de l'efficacité levuricide = Réduction logarithmique au moins égale à 3 Log décimaux dans les conditions de l'essai.

### IV- CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Période d'analyse : du 20/01/16 au 22/01/16
- Analyse réalisée par : M.TEULIER
- Méthode d'essai : méthode par dilution/neutralisation
- Diluant du produit utilisé au cours de l'essai : eau dure 30°f
- Concentrations de produit testé (V/V) : 20% - 40% - 97%
- Aspect des dilutions : limpide
- Technique de dénombrement : dénombrement en profondeur
- Temps de contact : 15 minutes (+/- 10 secondes)
- Température d'essai : 20°C (+/-1°C)
- Substance interférente : Albumine bovine 3 g/l (conditions de saleté)
- Température d'incubation : 30°C (+/-1°C)
- Identification de la souche utilisée :
  - *Candida albicans* DSM 1386 (séchage pendant 25 minutes à 37°C +/-1°C)
- Neutralisant (m/V) : Saponine 3% ; Polysorbate 80 3% ; Lécithine 0,3% ; Thiosulfate de sodium 0,5% ; L-Histidine 0,1% (Stérilisé à 121°C pendant 20 minutes).
- Surfaces d'essai : disques en acier inoxydable 304 (2 cm de diamètre) dont les 2 faces ont une finition de grade 2b (nettoyées dans une solution de DECON® à 5%, pendant 60 minutes, rincées à l'eau distillée pendant 10 secondes puis stérilisées dans un bain contenant 70% (V) d'isopropanol pendant 15 minutes puis séchage sous un flux d'air laminaire).

Le décrochage des micro-organismes est réalisé par contact et frottement de la surface avec des billes de verre de 3 mm de diamètre.



**RAPPORT D'ESSAI**  
**3818-1**

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

Imprimé le : 26/01/16  
Date de 1<sup>ère</sup> impression : 26/01/16  
Page 3 sur 5

**V- RESULTATS D'ESSAI**

*Vc : nombre de colonies comptées sur les boîtes,*

*N: logarithme du nombre de cellules dénombrées par 0,025 ml dans la suspension microbienne d'essai et de la suspension de validation,*

*Nd: logarithme du nombre d'UFC/surface d'essai pour l'essai avec le désinfectant,*

*Nc: logarithme du nombre d'UFC/surface d'essai pour le témoin d'eau,*

*NC: logarithme du nombre d'UFC/surface d'essai du témoin du neutralisant,*

*NT : logarithme du nombre d'UFC/surface d'essai du témoin de validation de la méthode (dilution/neutralisation),*

*R : réduction logarithmique décimale ( $R= Nc-Nd$ ).*

# RAPPORT D'ESSAI

## 3818-1

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

Imprimé le : 26/01/16  
 Date de 1<sup>ère</sup> impression : 26/01/16  
 Page 4 sur 5

### Essai sur *Candida albicans* DSM 1386

Souche testée	Suspension microbienne d'essai	Essai de validation		
		Témoin d'eau (Nc)	Témoin du neutralisant (NC)	Validation de la méthode (NT)
<i>Candida albicans</i> DSM 1386 Lot 534	$10^{-5}$ : Vc1 = 322 Vc2 = 307	$10^{-2}$ : 183 ; 195	$10^{-2}$ : 183 ; 170	Pour 97% $10^{-2}$ : 184 ; 172
		$10^{-3}$ : 21 ; 19	$10^{-3}$ : 15 ; 16	$10^{-3}$ : 20 ; 16
	$10^{-6}$ : Vc1= 41 Vc2= 39	$10^{-4}$ : 3 ; 3	$10^{-4}$ : 2 ; 1	$10^{-4}$ : 4 ; 3
	N= 5,91	Nts >100 Nc = 5,28	NC = 5,26	NT = 5,26

L'essai est validé si :

N est compris entre 5,57 et 6,10 log

Nc est supérieur ou égal à 5,27 log

NC est supérieur à 0,5.Nc

NT est supérieur à 0,5.Nc et n'est pas supérieur à +/-0,3

Nts est inférieur à 100 pour les concentrations actives

Le quotient des dénombrements obtenus par moyenne pondérée est compris entre 5 et 15  
 (applicable seulement sur N)

Souche testée		Concentrations testées (V/V)				
		20 %	40 %	97 %		
<i>Candida albicans</i> DSM 1386 Lot 534	$10^0$	0 ; 0	0 ; 0	0 ; 0		
	$10^{-1}$	0 ; 0	0 ; 0	0 ; 0		
	$10^{-2}$	0 ; 0	0 ; 0	0 ; 0		
	Dénombrement surface (Nts)	0	0	0		
	Nd	< 0,1	< 0,1	< 0,1		
	R	> 5,18	> 5,18	> 5,18		

**RAPPORT D'ESSAI**  
**3818-1**

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

Imprimé le : 26/01/16  
Date de 1<sup>ère</sup> impression : 26/01/16  
Page 5 sur 5

**VI- CONCLUSION**

Selon la méthodologie de la norme NF EN 13697 (Juin 2015), le lot 830485 du produit 1300 de la société CHRISTEYNS FRANCE, dans les conditions d'essai suivantes :


- en 15 minutes de temps de contact,
- à la température d'essai de 20°C,
- en présence d'albumine bovine à 3 g/l (conditions de saleté),

présente une activité levuricide sur les surfaces (réduction supérieure ou égale à 3 Log décimaux), lorsqu'il est dilué à 20%, 40% et 97% (V/V) vis-à-vis de la souche *Candida albicans* DSM 1386.

La souche est conservée et contrôlée selon la norme NF EN 12353.  
La souche d'essai a été soumise à essai une seule fois.

**VII-SIGNATURES**

Fait à DINARD, le 29/01/16

Rédigé par	Validé par
<p>M. TEULIER Responsable d'essai</p> 	<p>M. SESQUES Docteur en microbiologie Directeur technique</p> 



20.11.2009

**Test report no. P09ML928-3SI**

Evaluation of the effectiveness of  
**Phagospray DM**

Test virus: Influenza A virus H1N1 (swine)

Method: following EN 14476:2007-02 under dirty  
conditions

TEST REPORT

**Client:**

LABORATOIRES PHAGOGENE GROUPE RIVADIS  
B.P. 111  
F-79103 THOUARS Cedex





## 1. Introduction

The objective of this study was to evaluate the virus-inactivating properties of the surface disinfectant Phagospray DM against influenza A virus H1N1 (swine) using a quantitative suspension assay following EN 14476:2007-02 (1) under dirty conditions.

## 2. Test laboratory

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

## 3. Identification of the sample

Manufacturer	LABORATOIRE PHAGOGENE
Name of product	Phagospray DM
Application	surface disinfection
Batch number	-
Expiry date	-
Active compound (s)	-
Appearance and odor	clear, colourless liquid; product specific
pH-value (s)	undiluted: 9.57 (20°C)
Storage conditions	room temperature in the dark (area with restricted access)
Date of arrival in the laboratory	12.10.2009

## 4. Materials

### 4.1 Culture medium and reagents

- Eagle`s Minimum Essential Medium with Earle`s BSS (EMEM, Lonza Group Ltd., catalogue no. BE12-125F)
- Fetal calf serum (Biochrom AG, article no. S 0115)
- 1.4 % Formaldehyde solution (Chemisch-technologisches Laboratorium Dr. Melzer, D-28199 Bremen)
- Aqua bidest. (Fresenius Kabi Deutschland, article no. P2N 1636071)
- PBS (Invitrogen, article no. 18912-014)
- BSA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, article no. CA-2153)
- sheep erythrocytes (Fiebig-Nährstofftechnik; article no. 31100100)



## 4.2 Virus and cells

The influenza A virus sw/Greven/IDT2889/2004 H1N1 virus was obtained from Prof. Dr. Georg Herrler, Institute of Virology at the School of Veterinary Medicine Hannover (Tierärztliche Hochschule, D-30559 Hannover). This virus strain was introduced in this study as surrogate of the pandemic strain influenza A virus /California/04/2009 H1N1 (new influenza A (H1N1) virus (Swine Lineage) due to bio safety reasons.

The *MDCK cells* were obtained from the Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (formerly Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, isle of Riems) (Dr. R. Riebe, catalogue no. RIE 244).

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.

## 4.3 Apparatus, glassware and small items of equipment

- CO<sub>2</sub> 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)
- Water bath (JULABO, Julabo U 3)
- Adjustable volume automatic pipettes (Eppendorf AG)
- Polysterol 96-well microtiter plate (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Germany)
- Cell culture flask (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Germany)
- Sealed test tubes (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany)
- MicroSpin<sup>TM</sup> S-400 HR columns (GE Healthcare, Freiburg, Germany)



## 5. Experimental conditions

Test temperature	20°C ± 1.0°C
Concentration of test product	undiluted (80.0 %) and 10.0 % solutions (non-active range)
Contact time(s)	30 seconds
Interfering substance	dirty conditions: 3.0 g/l BSA + 3.0 g/l erythrocytes
Diluent	water of standardised hardness (10.0 % solution)
Procedure to stop action of product	immediate dilution and gel filtration
Test virus strain	influenza A virus sw/Greven/IDT2889/2004 H1N1
Test period	12.10.2009 – 20.11.2009
End of testing	20.11.2009

## 6. Methods

### 6.1 Preparation of test virus suspension

To prepare the test virus suspension, *MDCK cells* that had been cultured with Eagle's minimum essential medium (EMEM) and 10 % or 2 % fetal calf serum (FCS, Biochrom AG, Berlin, Germany) were inoculated with swine influenza A virus in 175 cm<sup>2</sup> cell culture flasks (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Germany). Once a cytopathic effect had been induced (approx. 24 hours), freezing and thawing was carried out once. The cell debris was removed by centrifugation at 3.000 rpm for ten minutes (4°C) and the supernatant was recovered as test virus suspension and stored in aliquots at -80°C.

### 6.2 Disinfectant

The test product was evaluated undiluted. Due to the addition of test virus suspension and interfering substance (dirty conditions) an 80.0 % solution resulted. The product was also tested as 10.0 % solution (demonstration of non-active range).

The 10.0 % solution was prepared with water of standardised hardness immediately before the inactivation tests.

### 6.3 Infectivity assay

Infectivity was determined by means of end point dilution method using the microtitre process. For this, 100 µl aliquots of the samples, which had been serially diluted with ice-cold



EMEM, were transferred to eight cups of a sterile polystyrol 96-well microtitre plate with a preformed monolayer of *MDCK cells* (placed in each well on the previous day; 100 µl aliquots with approx.  $1.5 \times 10^4$  cells). Incubation took place at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator (5 % CO<sub>2</sub> content) for five days. Finally, cultures were observed for cytopathic effects with a reversed microscope and the infective dose TCID<sub>50</sub>/ml was calculated with the method of Kärber (2) and Spearman (3) with the following formula:

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

meaning

$X_0$  = log<sub>10</sub> 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.

#### 6.4 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: 2007-02, 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<sub>10</sub>-steps within the recommended exposure period.

#### 6.5 Inactivation assays

Investigations for determination of virucidal activity followed to EN 6.6. The test product was examined undiluted (80.0 %) and 10.0 % solution in hard water according to EN 5.2.2.2. 30 seconds were chosen as contact time.

Due to a more convenient handling, the volumes in this assay were 0.1 ml test virus suspension, 0.1 ml interfering substance and 0.8 ml test product. Immediately at the end of a chosen contact time, activity of the disinfectant was stopped by dilution to 10<sup>-8</sup>.

Since the cytotoxicity did not allow following the reduction of residual infectivity titre over the range of four log<sub>10</sub>-steps, ready to use MicroSpin™ S-400 HR columns were used in order to remove the cytotoxic agents according to the instructions of the manufacturer. Virus controls with and without MicroSpin™ S-400 HR columns were included.





Titration of the virus control was performed at contact times 0 min and 60 min (EN 6.6.8).

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

Inactivation tests were carried out in sealed test tubes in a water bath at  $20^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ . Aliquots were retained after appropriate exposure times, and residual infectivity was determined.

### **6.6 Determination of cytotoxicity**

Determination of cytotoxicity was performed according to EN 6.6.4.1 with 200  $\mu\text{l}$  hard water and 800  $\mu\text{l}$  test product.

Values are given as  $\log_{10}\text{CD}_{50}/\text{ml}$  (in analogy to  $\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ).

### **6.7 Cell sensitivity to virus**

For the control of cell sensitivity to virus two parts by volume hard water were mixed with eight parts by volume of the product. This mixture was added to a MicroSpin<sup>TM</sup> S-400 HR column and diluted after centrifugation and transferred to the cells.

Finally, a comparative titration of the test virus suspension was performed on the treated and non-treated cells.

### **6.8 Control of efficacy for suppression of disinfectant activity**

Furthermore, a control of efficiency for suppression of disinfectant activity was included (EN 6.6.6).

### **6.9 Reference virus inactivation test**

A 0.7 (w/v) % formaldehyde solution was included as reference for test validation according to EN 6.6.7.1. Contact times were 5 and 15 minutes. In addition, cytotoxicity of formaldehyde test solution was determined following EN 6.6.7.2 with dilutions up to  $10^{-5}$ .

## **7. Verification of the methodology**

The following criteria as mentioned in EN 8.3 were fulfilled:

- a) The titre of the test virus suspension allowed the determination of a 4  $\log_{10}$  reduction after gel filtration
- b) The cytotoxicity of the test product (80.0 % solution) was two  $\log_{10}$  steps.



- c) The comparative titration on pretreated (disinfectant) and non pretreated (PBS) *MDCK* cells showed an acceptable difference ( $<1 \log_{10}$ ; EN 8.3) of virus titres: 6.75 (PBS) versus 6.63 (disinfectant)  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml.
- d) The control of efficacy for suppression of disinfectant activity showed a decrease in virus titre due to the fact that even the 10.0 % solution showed a slight reduction of virus titre even within 30 seconds.

Since all criteria following EN 8.3 were fulfilled, examination with influenza A virus H1N1 (swine) following EN 14476:2007-02 is valid.

## 8. Results

Results of examination are shown in tables 1 to 8. Tables 1 to 7 demonstrate the raw data, whereas table 8 gives a summary of results.

The test product (80.0 %) was able to inactivate influenza A virus H1N1 (swine) after 30 seconds in this quantitative suspension test. At that time point, no influenza A virus H1N1 (swine) was detectable.

Without columns it was not possible to demonstrate a reduction of four  $\log_{10}$ -steps. After introducing the columns, the 80.0 % solution was able to achieve a reduction factor of  $\geq 5.13$  (dirty conditions) after 30 seconds exposure time. This corresponds to an inactivation of  $\geq 99.999$  %.

The 10.0 % solution was not active against H1N1 after 30 seconds of exposure time. The reduction factor was 2.13.



## 9. Summary

In summary, a sufficient reduction of virus titre can be achieved by Phagospray DM undiluted after an exposure time of 30 seconds. Due to the lack of virological guidelines simulating practical conditions in Europe (phase 2, step 2 tests) the data of this quantitative suspension test lead to the recommendation to use the surface disinfectant Phagospray DM for inactivation of influenza A virus H1N1 (swine) as follows:

**undiluted      30 seconds**

**Bremen, 20.11.2009**



**- Dr. Jochen Steinmann -**



## 10. 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 (BGBl. I, 1994, page 1703). Appendix revised at 14. 05. 1997 (BGBl. 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.

## 11. Recorders to be maintained

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

The use of the MikroLab GmbH name, logo or any other representation of MikroLab GmbH, other than distribution of this report in it's entirety, without the written approval of MikroLab is prohibited. In addition, MikroLab GmbH may not be referred to in any form of promotional materials, press releases, advertising or similar materials (whether by print, broadcast, communication or electronic means) without the express permission of MikroLab GmbH.



## 12. Literature

1. EN 14476:2007-02: Chemical disinfectants and antiseptics – virucidal quantitative suspension test - Test method and requirements (phase 2, step 1)
2. Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch Exp Path Pharmac; 162, 1931, 480-487
3. Spearman, C.: The method of `right or wrong cases` (constant stimuli) without Gauss's formulae. Brit J Psychol; 2 1908, 227-242



## Appendix:

- Table 1: Raw data of Phagospray DM (80.0 %) tested against influenza A virus H1N1 (swine) without columns (1<sup>st</sup> assay)
- Table 2: Raw data of Phagospray DM (80.0 %) tested against influenza A virus H1N1 (swine) without columns (2<sup>nd</sup> assay)
- Table 3: Raw data of Phagospray DM (80.0 %) tested against influenza A virus H1N1 (swine) with columns
- Table 4: Raw data of Phagospray DM (10.0 %) tested against influenza A virus H1N1 (swine) without columns
- Table 5: Raw data of formaldehyde solution (0.7 %) tested against influenza A virus H1N1 (swine) without columns
- Table 6: Control of efficacy for suppression of disinfectant activity (80.0 %)
- Table 7: Raw data (influenza A virus H1N1 swine) for cell sensitivity (80.0 %) with columns
- Table 8: Summary of results with Phagospray DM and influenza A virus H1N1 (swine)



**Table 1 (1<sup>st</sup> assay): Raw data of Phagospray DM (80.0 %) tested against influenza A virus H1N1 (quantal test; 8 wells) without columns (2051)**

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log <sub>10</sub> )											
				1	2	3	4	5	6	7	8	9			
Test product	80.0%	dirty conditions	0.25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
			0.5	tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Test product cytotoxicity	80.0%	dirty conditions	1.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
			2.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	n.d.	n.d.	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.	n.d.	n.d.	
				n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
			60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
				n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Virus control	n.a.	dirty conditions	0	n.d.	n.d.	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	0004	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 (2<sup>nd</sup> assay): Raw data of Phagospray DM (80.0 %) tested against influenza A virus H1N1 (quantal test; 8 wells) without columns (2067)**

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log <sub>10</sub> )										
				1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Test product	80.0%	dirty conditions	0.25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			0.5	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.
			1.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product cytotoxicity	80.0%	dirty conditions	2.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	n.d.	n.d.	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.	n.d.	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Virus control	n.a.	dirty conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4434 3444	0104 0004	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	3224 4343	0001 0300	0000 0400	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 of Phagospray DM (80.0 %) tested against influenza A virus H1N1 (quantal test; 8 wells) with columns (2067)**

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions ( $\log_{10}$ )										
				1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Test product	80.0%	dirty conditions	0.25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
				0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
				0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Test product cytotoxicity	80.0%	dirty conditions	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
				0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
				n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
				n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
				n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Virus control	n.a.	dirty conditions	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4421	0000	0000	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4442	2143	0030	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 4: Raw data of Phagospray DM (10.0 %) tested against influenza A virus H1N1 (quantal test; 8 wells) without columns (2051)**

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log <sub>10</sub> )											
				1	2	3	4	5	6	7	8	9			
Test product	10.0%	dirty conditions	0.25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
			0.5	4444	4044	4000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
				4444	4142	4000	4000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Test product cytotoxicity	10.0%	dirty conditions	1.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
			2.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
				n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
			5	0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
				0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	15	n.d.	n.d.	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.	n.d.	n.d.	
				n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Virus control	n.a.	dirty conditions	60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
			n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
				0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Virus control	n.a.	dirty conditions	60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0004	0000	0000	0000	n.d.	
				4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	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 5: Raw data of formaldehyde solution (0.7 %) tested against influenza A virus H1N1 (quantal test; 8 wells) without columns (2067)**

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log <sub>10</sub> )													
				1	2	3	4	5	6	7	8	9					
Test product	80.0%	PBS	0.25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
				n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
				n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
				n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Test product cytotoxicity	80.0%	PBS	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
				tttt	tttt	4000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.		
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	15	tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.		
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
				n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
				n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
				n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Virus control	n.a.	PBS	60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000		
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	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: Control of efficacy for suppression of disinfectant activity (80.0 %) (2067)**

Product	Interfering substance	Dilutions (log <sub>10</sub> )										
		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.	n.d.	n.d.
Test product	clean conditions	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product	dirty conditions	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	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 7: Raw data (influenza A virus H1N1) for cell sensitivity (80.0 %) with columns (2067)**

Product	Interfering substance	Dilution	Dilutions ( $\log_{10}$ )										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9		
PBS	PBS	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PBS	clean conditions	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PBS	dirty conditions	-	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	2443 4121	0200 0000	0000 0003	0000 0000	n.d.	n.d.
Test product	PBS	80.0%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product	clean conditions	80.0%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product	dirty conditions	80.0%	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4244 2331	0002 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.

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

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



Accredited by  
Zentralstelle der Länder  
für Gesundheitsschutz  
bei Arzneimitteln  
und Medizinprodukten  
ZLG-P-429.08.10

**Final test report # J08ML664R  
submitted to**

**Laboratoire Rivadis  
BP 111  
F-79103 THOUARS CEDEX**

**Evaluation of effectiveness of  
Nettoyant désinfectant  
hydroalcoolique – DE 515  
against  
human rotavirus strain Wa**

Test method following EN 14476:2007-02

MikroLab GmbH  
Norderoog 2  
D-28259 Bremen

Phone.: +49 (0) 421-27819102  
Fax: + 49 (0) 421-2760283  
E-mail: [MikroLab.GmbH@t-online.de](mailto:MikroLab.GmbH@t-online.de)  
<http://www.mikrolab-gmbh.de>

26.09.2008



## 1. Introduction

The objective of this study was to evaluate the virus-inactivating properties of the surface disinfectant Nettoyant désinfectant hydroalcoolique – DE 515 against human rotavirus strain Wa using a quantitative suspension assay following EN 14476:2007-02 (1).

## 2. Test laboratory

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

## 3. Identification of the sample

Manufacturer	Laboratoire Rivadis
Name of product	Nettoyant désinfectant hydroalcoolique – DE 515
Application	surface disinfection
Batch number and reference	805051 – 10 kg – 05/05/2008
Expiry date	-
Active compound (s)	-
Appearance and odour	clear, colourless liquid product specific
pH-value (s)	undiluted: 9.58 (20°C)
Storage conditions	room temperature in the dark (area with restricted access)
Date of arrival in the laboratory	07.08.2008

## 4. Materials

### 4.1 Culture medium and reagents

- Eagle`s Minimum Essential Medium with Earle`s BSS (EMEM, Cambrex Bio Science Verviers s.p.r.l., catalogue no. 12-125F)
- fetal calf serum (Biochrom AG, article no. S 0115)
- formaldehyde (Riedel-de-Häen, article no. 33220)
- Aqua bidest. (Fresenius Kabi Deutschland, article no. P2N 1636071)
- PBS (Invitrogen, article no. 18912-014)



## 4.2 Virus and cells

The human rotavirus strain Wa (serotype 1, subgroup II) was obtained by Prof. Dr. Holger Rabenau, Institute of Medical Virology of the Johann Wolfgang Goethe University of Frankfurt, D-60596 Frankfurt. Before the described tests, the virus had been passaged ten times in *MA-104 cells* (*embryonic rhesus monkey kidney cell line*).

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.

## 4.3 Apparatus, glassware and small items of equipment

- CO<sub>2</sub> 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)
- Water bath (JULABO, Julabo U 3)
- Adjustable volume automatic pipettes (Eppendorf AG)

## 5. Experimental conditions

Test temperature	20°C ± 1°C
Concentration of test product	undiluted (90.0 %), 50.0 % and 10.0 % solution
Contact times	5, 15 and 60 minutes
Interfering substances	not possible
Diluent	water of standardised hardness (50.0 % and 10.0 %)
Procedure to stop action of product	immediate dilution
Test virus	human rotavirus strain Wa
Period of analysis	07.08.2008 - 26.09.2008
End of testing	26.09.2008





## 6. Methods

### 6.1 Preparation of test virus suspension

After three washings with serum-free Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM; Cambrex Bio Science Verviers s.p.r.l., B-4800 Verviers, Belgium) cells were incubated with EMEM without fetal calf serum (FCS, Biochrom AG, D-12247 Berlin, Germany) for three hours to eliminate all FCS. This was followed by the addition of virus (stock virus suspension) to *MA-104 cells* with a multiplicity of infection of 0.01-0.1 TCID<sub>50</sub>/cell in the presence of 5.0 µg/mL 1:250 trypsin (SERVA Electrophoresis GmbH, D-69115 Heidelberg, Germany) at 37°C for 60 minutes. After this time, EMEM with 5.0 µg/mL 1:250 trypsin was added. After appearance of the cytopathic effect, cells were subjected to a rapid three-fold freeze-thawing procedure (-80°C for 20 min; 37°C for 10 min). The resulting fluid was centrifuged at 800 x g for 10 min at 4°C to eliminate cell debris. After aliquotation the supernatant was stored as test virus suspension at -80°C.

### 6.2 Preparation of disinfectant dilutions

The surface disinfectant Nettoyant désinfectant hydroalcoolique – DE 515 was evaluated undiluted (90.0 %) and as 50 % and 10 % solutions. These solutions (for demonstration of non-active range) were prepared with water of standardised hardness (WSH) immediately before the inactivation tests.

### 6.3 Inactivation assays and controls (EN 14476:2007-02)

Tests were carried out following the EN 14476:2007-02 (1). Nine parts by volume of the disinfectant were mixed with one part by volume of test virus suspension.

Due to a more convenient handling and due to a limited amount of test virus suspension, the volumes in the inactivation assay were 0.1 mL test virus suspension and 0.9 mL test product.

Virus controls were incorporated after the longest exposure time. One part by volume of test virus suspension was mixed with nine parts by volume of hard water.

As reference a formaldehyde control (0.7 %) was included with one part by volume of test virus suspension, four parts by volume of PBS (0.1 M, pH value 7.0) and five parts by volume of 1.4 % formaldehyde solution. 5, 15, 30 und 60 minutes were chosen as contact times. To determine the cytotoxicity of the formaldehyde solution, equal parts by volume of PBS were mixed with equal parts by volume of the formaldehyde solution.

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



For determination of cytotoxicity of the disinfectant, one part by volume of hard water were mixed with nine parts by volume of the disinfectant, diluted with ice-cold EMEM and inoculated into the cell culture. Values are given as  $\log_{10}CD_{50}/mL$  (in analogy to  $\log_{10}TCID_{50}/mL$ ).

Inactivation tests were carried out in sealed test tubes (Sarstedt AG & Co., D-51588 Nümbrecht, Germany) in a water bath at  $20^{\circ}C \pm 0.5^{\circ}C$ . Aliquots were retained after appropriate exposure times, and residual infectivity was determined.

#### 6.4 Determination of infectivity

Infectivity was determined by means of end point dilution titration in a micro-procedure. For this, samples were diluted with ice-cold EMEM with 5  $\mu g/mL$  trypsin and 100  $\mu L$  of each dilution were placed after aspiration of the medium in eight wells of a sterile polystyrene flat bottom 96-well microtitre plate (Nunc A/S, DK-4000 Roskilde, Denmark) with a preformed MA-104 monolayer. After one hour at  $37^{\circ}C$ , 100  $\mu L$  EMEM with 5  $\mu g/mL$  trypsin were added. Incubation was at  $37^{\circ}C$  in a  $CO_2$ -atmosphere (5.0 %  $CO_2$  - content). Finally, cultures were observed for cytopathic effects for ten days of inoculation. The infective dose ( $TCID_{50}$ ) was calculated according to 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.

#### 7. Verification of the methodology

The following criteria as mentioned in EN 8.3 were fulfilled:

- a) The titre of the test virus suspension allowed the determination of 4  $\log_{10}$  reduction.
- b) The cytotoxicity of the test product (90.0 %, 50.0 % and 10.0 %) was two  $\log_{10}$  steps thus allowing the detection of a four  $\log_{10}$  reduction of virus titre.



- c) The comparative titration on pre-treated (90.0 % solution of the disinfectant) and non pre-treated (PBS) *Ma-104 cells* showed no significant difference ( $<1 \log_{10}$ ; EN 8.3) of virus titre: 9.00 (PBS) versus 8.38 (disinfectant)  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL.
- d) The control of efficacy for suppression of disinfectant activity showed no decrease of virus titre.

Since all criteria following EN 8.3 were fulfilled, examination with rotavirus following EN 14476:2007-02 is valide.

## 8. Results

Results of examination are shown in tables 1 to 7. Tables 1 to 6 demonstrate the raw data, whereas table 7 gives a summary of results. In summary, Nettoyant désinfectant hydroalcoolique – DE 515 (90.0 %) was able to inactivate rotavirus after five minutes in this quantitative suspension test. The reduction factor was  $\geq 5.13$ . The 50.0 % solution also demonstrated an effectiveness against human rotavirus.

The 10.0 % solution was not able to inactivate rotavirus after 60 minutes of exposure time.

## 9. Summary

The surface disinfectant Nettoyant désinfectant hydroalcoolique – DE 515 of Laboratoires Rivadis demonstrated effectiveness undiluted (90.0 %) against rotavirus after a contact time of fives minutes. Therefore, Nettoyant désinfectant hydroalcoolique – DE 515 can be declared as active against rotavirus as follows:

**undiluted 5 min**

**Bremen, 26.09.2008**

  
- Dr. Jochen Steinmann -



## 10. 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 (BGBl. I, 1994, page 1703). Appendix revised at 14. 05. 1997 (BGBl. 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.

## 11. Recorders to be maintained

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

The use of the MikroLab GmbH name, logo or any other representation of MikroLab GmbH, other than distribution of this report in its entirety, without the written approval of MikroLab is prohibited. In addition, MikroLab GmbH may not be referred to in any form of promotional materials, press releases, advertising or similar materials (whether by print, broadcast, communication or electronic means) without the express permission of MikroLab GmbH.

The test results in this test report only relate to the items examined.



## 12. Literature

1. EN 14476:2007-02: Chemical disinfectants and antiseptics – virucidal quantitative suspension 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 Pharmac; 162, 1931, 480-487



## Appendix:

Table 1:	Raw data of Nettoyant désinfectant hydroalcoolique – DE 515 (90.0 %) examining virucidal activity against rotavirus (1 <sup>st</sup> assay)
Table 2:	Raw data of Nettoyant désinfectant hydroalcoolique – DE 515 (90.0 %) examining virucidal activity against rotavirus (2 <sup>nd</sup> assay)
Table 3:	Raw data of Nettoyant désinfectant hydroalcoolique – DE 515 (50.0 %) examining virucidal activity against rotavirus
Table 4:	Raw data of Nettoyant désinfectant hydroalcoolique – DE 515 (10.0 %) examining virucidal activity against rotavirus
Table 5:	control of efficacy for suppression of disinfectant activity
Table 6:	control of cell sensitivity to virus
Table 7:	summary of results



**Table 1: Raw data for Nettoyant désinfectant hydroalcoolique – DE 515 (90.0 %) tested against rotavirus (quantal test; 8 wells) (1519, 1531) (1<sup>st</sup> assay)**

Product	Concentration	Interfering Substance	Contact time (min)	Dilutions (log <sub>10</sub> )												
				1	2	3	4	5	6	7	8	9				
Test product	90.0%	-	5	tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.		
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
Test product cytotoxicity	90.0%	-	n.a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4340	
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4004
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	60	tttt	tttt	3333	2003	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000		
				tttt	tttt	3343	2000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000		
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
Virus control	n.a.	-	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0332	0100	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4434		
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000		
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	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)



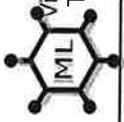
**Table 2: Raw data for Nettoyant désinfectant hydroalcoolique – DE 515 (90.0 %) tested against rotavirus quantal test; 8 wells (1531) (2<sup>nd</sup> assay)**

Product	Concentration	Interfering Substance	Contact time (min)	Dilutions (log <sub>10</sub> )													
				1	2	3	4	5	6	7	8	9					
Test product	90.0%	-	5	tttt	tttt	0020	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.			
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000		
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
Test product cytotoxicity	90.0%	-	n.a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4340	0000		
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4004	0000
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	15	tttt	tttt	3333	3333	3333	3333	3333	3333	3333	3333	3333	0000		
				tttt	tttt	3343	3343	3343	3343	3343	3343	3343	3343	3343	3343	3343	0000
				tttt	tttt	3333	3333	3333	3333	3333	3333	3333	3333	3333	3333	3333	0000
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	60	tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000		
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
Virus control	n.a.	-	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4433		
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4343
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3324
Virus control	n.a.	-	60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444		
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	2134

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 Nettoyant désinfectant hydroalcoolique – DE 515 (50.0 %) tested against rotavirus quantal test; 8 wells (1531)**

Product	Concentration	Interfering Substance	Contact time (min)	Dilutions ( $log_{10}$ )													
				1	2	3	4	5	6	7	8	9					
Test product	50.0%	-	5	tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.		
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
Test product cytotoxicity	50.0%	-	n.a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4340	0000	0000	0000	n.d.		
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4004	0003	0000	0000	0000	n.d.
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt	tttt	3333	2003	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.		
				tttt	tttt	3343	2000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
Virus control	n.a.	-	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4433	0300	0000		
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4343	0000	0000
Virus control	n.a.	-	60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3324	0000		
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	2134	0030	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 Nettoyant désinfectant hydroalcoolique – DE 515 (10.0 %) tested against rotavirus type 5 (quantal test; 8 wells) (1531)**

Product	Concentration	Interfering Substance	Contact time (min)	Dilutions (log <sub>10</sub> )													
				1	2	3	4	5	6	7	8	9					
Test product	10.0%	-	5	tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4334	0003	0000	n.d.			
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	1334	0430	0000	0000	n.d.		
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3433	0020	0000	0000	n.d.	
Test product cytotoxicity	10.0%	-	n.a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4134	0000	0000	0000	0000	n.d.	
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	2333	0003	0000	0000	0000	0000	n.d.
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4340	0000	0000	n.d.			
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4004	0003	0000	0000	n.d.	
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	3334	0000	0000	0000	0000	n.d.	
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	15	tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	0033	0000	0000	n.d.			
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	3233	0000	0000	0000	0000	n.d.	
				tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	4444	3242	0000	0000	0000	0000	n.d.	
Virus control	n.a.	-	60	tttt	tttt	3333	2003	2000	2000	0000	0000	0000	0000	n.d.			
				tttt	tttt	3343	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.		
				tttt	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Virus control	n.a.	-	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4433	0300	0000		
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4343	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3324	0000	0000
Virus control	n.a.	-	60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	2134	0030	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	2134	0030	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	2134	0030	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: Control of efficacy for suppression of disinfectant activity (1531)**

product	interfering substance	dilutions (log <sub>10</sub> )								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
product	PBS	tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	0433	0000	0000
		tttt	tttt	4444	4444	4444	4444	3334	0000	0000
product	clean conditions	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
product	dirty conditions	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

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 (rotavirus) for cell sensitivity (1531)**

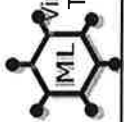
product	interfering substance	dilution	dilutions (log <sub>10</sub> )								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
PBS	PBS	without	4444	4444	4444	4444	4444	4444	2433	3000	0000
			4444	4444	4444	4444	4444	4444	3344	2104	0000
PBS	clean conditions	without	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PBS	dirty conditions	without	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product	PBS	1:10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		1:100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		1:1,000	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3333	0000	0000
Test product	clean conditions	1:10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		1:100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		1:1,000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product	dirty conditions	1:10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		1:100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		1:1,000	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

t = cytotoxic

0 = no virus detectable

1 to 4 = detection of virus (degree of CPE in 8 wells of a microtitre plate)



**Table 7: Summary of results with Nettoyant désinfectant hydroalcoolique – DE 515 and rotavirus**

Product	Con- centration	Interfering protein	Level of cytotoxicity	log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /mL after ....min								≥ 4 log <sub>10</sub> reduction after ... min
				0	0.5	1.0	2.0	5.0	15.0	30.0	60.0	
Test product	90.0 %	-	3.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	≤ 3.50	≤ 3.50	n.d.	≤ 3.50	5
Test product	90.0 %	-	3.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	≤ 3.50	≤ 3.50	n.d.	≤ 3.50	5
Test product	50.0 %	-	3.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	≤ 3.50	≤ 3.50	n.d.	≤ 3.50	5
Test product	10.0 %	-	3.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.88	7.50	n.d.	6.63	> 60
Form- aldehyde	0.7% (m/V)	PBS	3.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.25	6.75	6.50	4.88	> 60
Virus control	n.a.	-	n.a.	8.63	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.50/8.63	n.a.
Cell sens. (PBS)	n.a.	-	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9.00	n.a.
Cell sens. (disinfectant)	1:1,000	-	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8.38	n.a.

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

## NOTE D'INFORMATION

Objet : Efficacité du **Phagospray DM** sur HIV-1 et HBV

Le produit **ASPHERE SPRAY** initialement proposé par le Laboratoire Phagogène à changer de nom pour devenir **PHAGOSPRAY DM**.

Le changement de nom s'accompagne d'une reformulation du produit **ASPHERE SPRAY** avec un changement de parfum afin de proposer un parfum agréé pour l'utilisation sur les surfaces pouvant entrer en contact avec les denrées alimentaires.

Ce changement mineur de formulation n'a aucune incidence sur l'activité désinfectante du produit.

De ce fait, les tests microbiologiques passés sur le produit **ASPHERE SPRAY** restent valides pour le produit **PHAGOSPRAY DM**, notamment sur HIV-1 et HBV.

Fait le 20/01/2012 à Nantes,

  
Olivier COTTRON  
Pharmacien responsable

**RAPPORT D'ESSAI**  
**ETUDE DE L'EFFICACITE DU DESINFECTANT**  
**ASPHENE SPRAY**  
**SUR LE POUVOIR INFECTIEUX**  
**DU VIRUS HIV<sub>1</sub> (agent étiologique du S.I.D.A.)**

n° rapport IPL : NC/0871097

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

**I - INTRODUCTION :**

Le but de l'expertise est de déterminer la concentration et le temps d'action nécessaire à un désinfectant pour inactiver au moins  $10^5$  particules infectieuses de virus HIV<sub>1</sub>.

Deux tests sont utilisés :

- action du désinfectant sur l'enzyme du virus HIV<sub>1</sub>
- étude du pouvoir infectieux résiduel pour la lignée de lymphocytes T humains MT<sub>4</sub>.

**II - MATERIEL**

**Identification du produit :**

Nom du produit : ASPHENE SPRAY - Spray décontaminant

Envoyé par : Laboratoires RIVADIS - 25, rue du Petit Rosé - B.P. 111 - LOUZY - 79103 THOUARS

Date de réception : 16/06/97

Aspect du produit : liquide incolore - odeur irritante

pH : voisin de pH 12

ce document comporte 9 pages

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

a) Le virus HIV<sub>1</sub> : le virus (souche HTLV<sub>III</sub>B) est issu d'un surnageant de culture cellulaire MOLT<sub>4</sub> infectée entretenue au laboratoire.

Le titre du surnageant est évalué par dosage de l'activité transcriptase inverse (ATI) et par mesure de l'infectivité pour la lignée continue utilisée dans le test (MT<sub>4</sub>)

Virus expérimental d'ATI :  $5 \times 10^6$  CPM équivalents /ml  
de titre infectieux après 2 semaines de culture =  $10^5$  Particules infectieuses / ml

b) la lignée de cellules T humaines (MT<sub>4</sub>) utilisée dans le test lors de l'infection par le virus HIV, cette lignée permet d'observer un effet cytopathogène (ECP).

Cet effet cytopathogène est directement corrélé à la quantité de virus utilisé pour l'infection, à sa répllication et à l'expression des antigènes viraux par les cellules.

Toute inhibition de cet effet cytopathogène correspond à une inhibition de la multiplication du virus HIV<sub>1</sub>.

Nous exprimerons dans un tableau la date d'apparition d'un ECP dans les cultures de la façon suivante :

++++ ECP maximum (100 %) mort cellulaire

+++ ECP 70 %

++ ECP 50 %

+ ECP 10 %

0 ECP non décelé



### III - METHODES

#### 1) Traitement du virus HIV<sub>1</sub> par le désinfectant ASPHENE SPRAY

Nous utilisons le surnageant viral précédemment cité. Pour chacune des dilutions du désinfectant et aux temps d'incubation préconisés, 2 tubes de 0,5 ml de surnageant viral expérimental ( $2 \times 10^6$  CMP équivalents /tube) sont utilisés.

a) Le virus réparti dans chacun des tubes à réaction est concentré par ultracentrifugation (5' à 100 000 RPM).

Nous déposons sur chaque culot de virus 100 µl d'ASPHENE SPRAY aux concentrations indiquées . Les tubes sont homogénéisés et le temps de contact est respecté.

La réaction est stoppée en alignant tous les volumes à 1 ml avec de l'eau distillée.

b) les tubes sont ultracentrifugés de façon à concentrer le virus résiduel.

Nous procédons de la même façon pour les témoins non traités.

Chaque culot viral est lavé une fois en eau distillée puis repris dans un tampon Tris-EDTA (40 µl), divisé en deux parties égales.

- la première partie après addition du TRITON (x 100) (0,1 %) servira au dosage de l'activité transcriptase inverse résiduelle.

- la deuxième partie sera incubée en présence de cellules MT<sub>4</sub> sensibles pendant 1 h 30 à 37°C.

Ces cellules seront mises en culture dans un milieu RPMI contenant 10 % de sérum de veau foetal, 1 % de glutamine et 1 % d'antibiotiques.

Les cultures sont maintenues par passage pendant 10 jours après l'apparition d'un ECP caractéristique dans le groupe Témoin virus non traité soit environ 2 semaines au total.

En fin de culture, un lysat cellulaire sera effectué par addition de Triton (x 100) à 0,1 % final et la présence de virus intracellulaire non détecté par la lecture de l'ECP sera mise en évidence par un dosage enzymatique de la P24 spécifique du virus HIV<sub>1</sub>.

Nous utiliserons le kit commercialisé par la société ABBOTT qui permet la détection de 50 picogrammes /ml de P 24.

Selon cette expérimentation, nous déterminons les conditions d'efficacité d'un désinfectant pour inactiver au moins  $10^5$  unités infectieuses de virus HIV<sub>1</sub>.

## 2) Mesure de l'activité Transcriptase inverse

L'activité transcriptase inverse est dosée à partir de 0,5 ml de surnageant viral expérimental traité ou non par le désinfectant, après concentration par ultracentrifugation 5' à 100 000 rpm. Chaque culot viral est resuspendu dans 40 µl de tampon NTE. 20 µl servira au dosage de l'ATI après addition de 0,1 % de TRITON (x100).

L'activité enzymatique est révélée par l'addition du 20 µl de mélange réactionnel suivant :

Tris 50 m M pH 7,9

Kcl 20 m M

Mg Cl<sub>2</sub> 5 m M

Dithiotreitol 1 m M

poly rA 0,05 OD/ml

oligo dT 12-18 0,05 OD/ml

<sup>3</sup>H TTP 5 µCi

Après une incubation de 1 heure à 37°C les produits acido-insolubles sont précipités par de l'acide trichloracétique à 20 %, filtrés sur membranes de mitrocellulose 0,45 µm et la radioactivité β est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation KONTRON.

**TABLEAU I****CONDITIONS DE TRAITEMENT DE LA SOLUTION VIRALE**

Echantillons	Produit	Dilution	Temps d'incubation
A1	ASPHENE SPRAY	Pur	30 secondes
A2	ASPHENE SPRAY	Pur	1 minute
A3	ASPHENE SPRAY	Pur@	5 minutes
B Groupe témoin virus non traité	/	/	5 minutes
C Groupe témoin cellules MT4	/	/	/

**TABLEAU II**  
**ACTION DU PRODUIT ASPHENE SPRAY SUR LE VIRUS HIV**  
**PAR DOSAGE DE LA REVERSE TRANSCRIPTASE RESIDUELLE**  
(test réalisé en absence de Protéines)

Echantillons	ATI cmp/ml	Activité virale %	Inhibition virucide %
B1 Groupe témoin virus non traité	340 889	100	/
<u>ASPHENE utilisé pur</u>			
A1 contact 30 secondes	3 183	0,9	99,1
A2 contact 1 minute	276	0,1	99,9
A3 contact 5 minutes	2 540	0,7	99,3
Témoin positif de la réaction enzymatique 1 Unité de Reverse Transcriptase	12 846		
Témoin négatif de la réaction enzymatique (bruit de fond)	157		

Ce tableau montre que la Reverse transcriptase n'est pas retrouvée de façon significative après traitement du virus HIV1 par ASPHENE SPRAY utilisé pur dès les 30 premières secondes.

**TABLEAU III**  
 ETUDE DU POUVOIR INFECTIEUX RESIDUEL DE  
 CHAQUE ECHANTILLON PAR CULTURE SUR CELLULES MT<sub>4</sub>  
 (test réalisé en absence de protéines)

Evaluation de l'effet cytopathogène viral (microscopie)							
Echantillons	J+1	J+3	J+7	J+10	J+14	J+17	P24 en pg/ml lyse terminale
C Groupe témoin Cellule MT <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	34,6
B1 Groupe témoin Virus non traité	0 0	++++ ++++	++++détruit ++++détruit				> 1 000 > 1 000
<u>ASPHENE utilisé pur</u>	0	0	0	0	0	0	<b><u>115,3</u></b>
A1 contact 30 secondes	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	37,5
A2 contact 1 minute	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	19,3 31,7
A3 contact 5 minutes	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	25,8 26,5

Ce tableau montre que le pouvoir infectieux n'est pas retrouvé après traitement du virus HIV1 par ASPHENE SPRAY utilisé pur pendant au moins 1 minute.

**TABLEAU IV**  
**ETUDE DU POUVOIR INFECTIEUX DU SURNAGEANT VIRAL EXPERIMENTAL**

Evaluation de l'effet cytopathogène viral sur culture de MT <sub>4</sub> par microscopie					Lyse terminale dosage enzymatique de P24 en pg /ml
DILUTIONS DU SURNAGEANT VIRAL	J+3	J+7	J+10	<del>J+14</del>	
10 <sup>-1</sup>	++++détruit				NT
10 <sup>-2</sup>	+	++++détruit			NT
10 <sup>-3</sup>	+	++++détruit			NT
10 <sup>-4</sup>	0	++	++++détruit		> 1 000
10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	8,4
10 <sup>-6</sup>	0	0	0	0	0
10 <sup>-7</sup>	0	0	0	0	16,3
10 <sup>-8</sup>	0	0	0	0	45,6
Témoin Cellules MT4	0	0	0	0	35,3

**CONCLUSION :**

Par l'étude conjuguée du pouvoir infectieux résiduel et de la réverse transcriptase, nous concluons que le spray décontaminant ASPHENE est actif sur le virus HIV1 lorsqu'il est employé pur pendant au moins 1 minute.

Villeneuve d'Ascq, le 10 Octobre 1997

Responsable Technique

Joëlle DEWULF



Chef de Service

Docteur C. KREMBEL



**RAPPORT D'ESSAI**  
**EVALUATION DE L'EFFET DU PRODUIT**  
**ASPHENE SPRAY**

N° de rapport IPL : NC/0490697M

**SUR LE VIRUS DE L'HEPATITE B**

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

**Identification de l'échantillon**

Nom du produit : ASPHENE SPRAY

Commanditaire : Laboratoires RIVADIS – 25, rue du petit rosé – B.P. 11 – LOUZY – 79103 THOUARS

Date de réception au laboratoire : 16/06/97

pH : pur : 10,9 – 50 % : 9,9 – 25 % : 9,7

Aspect du produit : incolore

Adaptée de la technique de Frösner, Jentsch and Uthemann : Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. B 176 ; 1, 1982).

La technique utilisée teste l'inhibition de l'HbsAg par le désinfectant, dans une réaction antigène-anticorps.

Le désinfectant est dilué à 50 %, 25 % en eau pour préparation injectable.

L'efficacité de ce désinfectant contre le virus de l'Hépatite B est testée à la température ambiante (20°C).

Les temps de contact sont : 5, 10 et 15 minutes

**Méthode utilisée pour tester l'inactivation du virus**

L'évaluation est faite à température ambiante en présence ou non de protéines comme substances interférentes.

**Réaction**

1 volume sérum positif HbsAg (prédilué au 1/75 dans PBS)

1 volume eau distillée

ou 1 volume Alb bovine 2 %

ou 1 volume sérum veau fœtal

et 8 volumes de la concentration du désinfectant testé x 1,25

Incubation : 5, 10 et 15 minutes

Ce document comporte 4 pages

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

Le présent document ne saurait être interprété comme portant autorisation de faire référence à l'Institut Pasteur de Lille



**ASPHENE SPRAY****Concentration : Pur (80 % finale)**

Temps de contact	ED	2 % Alb TROUBLE	SVF PRECIPITE
5 minutes	113	98	83
10 minutes	100	89	78
15 minutes	79	81	65
Antigène sans désinfectant	1749	2718	3048
Désinfectant sans antigène	202	202	202

**Concentration : 50 %**

Temps de contact	ED TRES LEGER TROUBLE	2 % Alb PRECIPITE	SVF PRECIPITE
5 minutes	133	115	73
10 minutes	100	87	83
15 minutes	90	88	88
Antigène sans désinfectant	1749	2718	3048
Désinfectant sans antigène	202	202	202

Chiffres en cpm (coup par minute)

**ASPHENE SPRAY****Concentration : 25 %**

Temps de contact	ED TRES LEGER TROUBLE	2 % Alb PRECIPITE	SVF PRECIPITE
5 minutes	227	153	111
10 minutes	164	109	108
15 minutes	120	79	83
Antigène sans désinfectant	1727	2698	3009
Désinfectant sans antigène	186	186	186

### Arrêt de la réaction

Chaque mélange est dilué au 1/100 dans du PBS contenant 10 % SVF.

La quantité d'HbsAg restante est testée avec le Kit : Technique en Radioimmunoassy (Ausria II – 125 I Diagnostic Kit) Antibody to Hepatitis B surface Antigen 125 I (Humain)

Une valeur moyenne est calculée à partir de 2 essais (cpm 125 I anti-HBs). L'Ag résiduel couplé à l'anticorps est révélé par le marqueur radioactif.

### Témoins :

Le 100 % du couplage est calculé en faisant :

4témoins positifs avec 1 volume serum positif HbsAg + 1 volume eau distillée

4témoins positifs avec 1 volume serum positif HbsAg + 1 volume Albumine bovine 2 %

4 témoins positifs avec 1 volume serum positif HbsAg + 1 volume Serum Veau Fœtal

Chaque témoin est additionné de 8 volumes d'eau distillée et dilués au 1/100 dans PBS (10 % SVF)

Le 0 % du couplage correspond à la moyenne de 7 témoins négatifs pour lesquels chaque concentration du désinfectant à tester est diluée au 1/100 dans du PBS additionné de 10 % SVF.

Un nombre de cpm (x) est ainsi déterminé, très proche du témoin négatif du kit.

Toute valeur inférieure à 2.1 x (cut off) correspond à une inactivation totale de l'HbsAg. Le chiffre figurant dans les tableaux est donné après calcul du cut off.

### CONCLUSION :

La technique utilisée teste l'inhibition de l'HbsAg par le désinfectant, dans une réaction antigène-anticorps.

Le produit ASPHENE SPRAY est actif sur le virus de l'hépatite B à la concentration de 25 % après un temps de contact de 10 minutes en présence d'eau distillée. Il est ininterprétable en milieu protéique étant donné les troubles et précipités observés.

Villeneuve d'Ascq, le 24 Juin 1997

Réédité le 10 Novembre 2006

Responsable Technique

po A. TORPIER

Isabelle WATBLED



Chef de Service

po Docteur C. KREMBEL

Franck POLYN

