Alkacide®

Desinfectante tras limpieza desproteinizante con Alkazyme

Para la desinfección de alto nivel por inmersión

de los dispositivos médicos invasivos y no invasivos,

del instrumental quirúrgico,

de los endoscopios rígidos y flexibles

Archivo técnica

Alkapharm

SODEL - ISO 9001/13485
190 rue René Barthélemy, Pôle d'activités de l'Espérance, 14100 Lisieux, France.
TEL: +33 (0)2 31 31 10 50.
www.sodel-sa.eu - www.alkapharm.fr

SECCIÓN 1: Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad o la empresa

1.1. Identificador del producto

Forma del producto	:	Mezcla
Nombre comercial	:	ALKACIDE
Código de producto	:	1400-003-1
Tipo de producto	:	Producto desinfectante para uso de dispositivos médicos

1.2. Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados

1.2.1. Usos pertinentes identificados

Categoría de uso principal	:	Solo para uso profesional
Uso de la sustancia/mezcla	:	Desinfección por inmersión de dispositivos y equipos médicos Uso médico

1.2.2. Usos desaconsejados

No se dispone de más información

1.3. Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad

Fabricante
SODEL - Gamme ALKAPHARM
190 rue René Barthélémy
Apartado 94104
14104 LISIEUX - FRANCE
T +33 (0)2 31 31 10 50 - F +33 (0)2 31 31 80 60
info@sodel-sa.eu - www.sodel-sa.eu

1.4. Teléfono de emergencia

País	Organismo/Empresa	Dirección	Número de emergencia	Comentario
España	Unidad de Toxicología Clínica Servicio de Urgencias	Hospital Clinic I Provincial de Barcelona C/Villarroel, 170 08036 Barcelona	+34 93 227 98 33 +34 93 227 54 00 bleep 190	
España	Servicio de Información Toxicológica Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, Departamento de Sevilla	Carretera de San Jerónimo Km 0,4 41080 Sevilla	+34 91 562 04 20	

SECCIÓN 2: Identificación de los peligros

2.1. Clasificación de la sustancia o de la mezcla

Clasificación según reglamento (UE) No. 1272/2008 [CLP]

Toxicidad aguda (oral), categoría 4	H302
Toxicidad aguda (inhalación:polvo,niebla) Categoría 3	H331
Irritación o corrosión cutáneas, categoría 1, subcategoría 1B	H314
Lesiones oculares graves o irritación ocular, categoría 1	H318
Sensibilización respiratoria, categoría 1	H334
Sensibilización cutánea, categoría 1	H317
Toxicidad específica en determinados órganos — Exposición única, categoría 3, irritación de las vías respiratorias	H335
Peligroso para el medio ambiente acuático — Peligro agudo, categoría 1	H400
Peligroso para el medio ambiente acuático — Peligro crónico, categoría 3	H412

Texto completo de las frases H: véase la Sección 16

Efectos adversos fisicoquímicos, para la salud humana y el medio ambiente

Tóxico en caso de inhalación. Nocivo en caso de ingestión. Puede irritar las vías respiratorias. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Provoca lesiones oculares graves. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

2.2. Elementos de la etiqueta

Etiquetado según el Reglamento (CE) N° 1272/2008 [CLP]

Pictogramas de peligro (CLP) :

GHS05 GHS06 GHS08 GHS09

Palabra de advertencia (CLP) : Peligro

Contiene : GLUTARAL; Cloruro de didecildimetilamonio

Indicaciones de peligro (CLP) : H302 - Nocivo en caso de ingestión.
H314 - Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
H331 - Tóxico en caso de inhalación.
H334 - Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.
H335 - Puede irritar las vías respiratorias.
H410 - Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Consejos de prudencia (CLP) : P261 - Evitar respirar los vapores.
P271 - Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado.
P280 - Llevar guantes de protección, ropa de protección, equipo de protección para los ojos y la cara.
P301+P330+P331+P310 - EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagarse la boca. NO provocar el vómito. Llamar inmediatamente a un médico, un CENTRO DE TOXICOLOGÍA.
P303+P361+P353+P310 - EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ducharse.. Llamar inmediatamente a un médico, un CENTRO DE TOXICOLOGÍA.
P304+P340+P311 - EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar a un médico, un CENTRO DE TOXICOLOGÍA.
P305+P351+P338+P310 - EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado. Llamar inmediatamente a un médico, un CENTRO DE TOXICOLOGÍA.
P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P342+P311 - En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un médico, un CENTRO DE TOXICOLOGÍA.
P391 - Recoger el vertido.
P501 - Eliminar el contenido y el recipiente en un centro de recogida de residuos peligrosos o especiales, con arreglo a la normativa local, regional, nacional y/o internacional.

2.3. Otros peligros

Esta sustancia/mezcla no cumple los criterios PBT del anexo XIII del reglamento REACH
Esta sustancia/mezcla no cumple los criterios mPmB del anexo XIII del reglamento REACH

SECCIÓN 3: Composición/información sobre los componentes

3.1. Sustancias

No aplicable

3.2. Mezclas

Nombre	Identificador del producto	%	Clasificación según reglamento (UE) No. 1272/2008 [CLP]
GLUTARAL (Substancia activa (Biocida))	(N° CAS) 111-30-8 (N° CE) 203-856-5 (N° Índice) 605-022-00-X (REACH-no) 01-2119455549-26	≥ 5 – < 10	Acute Tox. 2 (Inhalation), H330 Acute Tox. 3 (Oral), H301 STOT SE 3, H335 Skin Corr. 1B, H314 Resp. Sens. 1, H334 Skin Sens. 1A, H317 Aquatic Acute 1, H400 Aquatic Chronic 2, H411
Cloruro de didecildimetilamonio (Substancia activa (Biocida))	(N° CAS) 7173-51-5 (N° CE) 230-525-2 (N° Índice) 612-131-00-6 (REACH-no) 01-2119945987-15	≥ 1 – < 5	Acute Tox. 4 (Oral), H302 Skin Corr. 1B, H314 Eye Dam. 1, H318 Aquatic Acute 1, H400 (M=10) Aquatic Chronic 2, H411

Límites de concentración específicos:		
Nombre	**Identificador del producto**	**Límites de concentración específicos**
GLUTARAL (Substancia activa (Biocida))	(N° CAS) 111-30-8 (N° CE) 203-856-5 (N° Índice) 605-022-00-X (REACH-no) 01-2119455549-26	(0,5 ≤C < 5) STOT SE 3, H335

Observaciones : En la fecha de revisión de la SDS, la mezcla no contiene “Sustancias extremadamente preocupantes » (SVHC) >= 0,1% publicadas por el Organismo Europeo de Productos Químicos (ECHA) según el artículo 57 del REACH

Texto completo de las frases H: ver sección 16

SECCIÓN 4: Primeros auxilios

4.1. Descripción de los primeros auxilios

Medidas de primeros auxilios general : De forma general, en caso de duda o si persisten los síntomas, llamar siempre a un médico. No administrar nada por vía oral a las personas en estado de inconsciencia.

Medidas de primeros auxilios en caso de inhalación : Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar a un médico. Si la persona está inconsciente, colocarla en posición de recuperación y llamar a un médico. Induzca la respiración artificial con la ayuda de una mascarilla de bolsillo equipada con una válvula de una vía o con otro dispositivo médico respiratorio adecuado, pero no realice el boca a boca.

Medidas de primeros auxilios en caso de contacto con la piel : Aclararse la piel con agua/ducharse. Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Llamar inmediatamente a un médico.

Medidas de primeros auxilios en caso de contacto con los ojos : Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llamar inmediatamente a un médico.

Medidas de primeros auxilios en caso de ingestión : Enjuagarse la boca. No provocar el vómito. Llamar inmediatamente a un médico.

4.2. Principales síntomas y efectos, agudos y retardados

Síntomas/efectos después de inhalación : Puede irritar las vías respiratorias. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.

Síntomas/efectos después de contacto con la piel : Quemaduras. Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Síntomas/efectos después del contacto con el ojo : Lesiones oculares graves.

Síntomas/efectos después de ingestión : Quemaduras.

4.3. Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente

Tratamiento sintomático.

SECCIÓN 5: Medidas de lucha contra incendios

5.1. Medios de extinción

Medios de extinción apropiados : Agua pulverizada. Polvo seco. Espuma. Dióxido de carbono.
Medios de extinción no apropiados : No utilizar flujos de agua potentes.

5.2. Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla

Peligro de incendio : No inflamable.
Productos de descomposición peligrosos en caso de incendio : Posible emisión de humos tóxicos. No respirar los humos.

5.3. Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios

Protección durante la extinción de incendios : No intervenir sin equipo de protección adecuado. Aparato autónomo y aislante de protección respiratoria. Protección completa del cuerpo.

SECCIÓN 6: Medidas en caso de vertido accidental

6.1. Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia

6.1.1. Para el personal que no forma parte de los servicios de emergencia

Procedimientos de emergencia : Ventilar la zona de derrame. Evitar el contacto con los ojos y la piel. No respirar la niebla.

6.1.2. Para el personal de emergencia

Equipo de protección : No intervenir sin equipo de protección adecuado. Para más información, ver sección 8 : "Control de la exposición-protección individual".

6.2. Precauciones relativas al medio ambiente

Evitar su liberación al medio ambiente. Evitar la entrada en sistemas de aguas pluviales o cursos de agua.

6.3. Métodos y material de contención y de limpieza

Para retención : Cubrir el derrame con un material incombustible, p. e. arena, tierra o vermiculita.
Procedimientos de limpieza : Absorber el líquido derramado mediante un producto absorbente.
Otros datos : Eliminar los materiales o residuos sólidos en un centro autorizado.

6.4. Referencia a otras secciones

Para más información, ver sección 13.

SECCIÓN 7: Manipulación y almacenamiento

7.1. Precauciones para una manipulación segura

Precauciones para una manipulación segura : Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado. Evitar el contacto con los ojos y la piel. No respirar la niebla. Llevar un equipo de protección individual.
Medidas de higiene : Lavar las prendas contaminadas antes de volver a usarlas. Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo. No comer, beber ni fumar durante su utilización. Lavarse las manos después de cualquier manipulación.

7.2. Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades

Condiciones de almacenamiento : Guardar bajo llave. Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente herméticamente cerrado. Mantener en lugar fresco.
Temperatura de almacenamiento : 5 – 35 °C
Lugar de almacenamiento : Proteger del calor. Almacenar en un lugar bien ventilado.
Normativa particular en cuanto al envase : Conservar únicamente en el recipiente original.

7.3. Usos específicos finales

No se dispone de más información

SECCIÓN 8: Controles de exposición/protección individual

8.1. Parámetros de control

GLUTARAL (111-30-8)	
España - Valores límite de exposición profesional	
Nombre local	Glutaraldehído
VLA-EC (mg/m³)	0,2 mg/m³
VLA-EC (ppm)	0,05 ppm
Notas	Sen (Sensibilizante).
Referencia normativa	Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España 2019. INSHT

Propan-2-ol; alcohol isopropílico; isopropanol (67-63-0)	
España - Valores límite de exposición profesional	
Nombre local	Isopropanol (Alcohol isopropílico)
VLA-ED (mg/m³)	500 mg/m³
VLA-ED (ppm)	200 ppm
VLA-EC (mg/m³)	1000 mg/m³
VLA-EC (ppm)	400 ppm
Notas	VLB® (Agente químico que tiene Valor Límite Biológico), s (Esta sustancia tiene prohibida total o parcialmente su comercialización y uso como fitosanitario y/o como biocida. Para una información detallada acerca de las prohibiciones consúltese: Base de datos de productos biocidas: http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/productos.do?tipo=plaguicidas Base de datos de productos fitosanitarios http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/Lista_sa.pdf).
Referencia normativa	Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España 2019. INSHT
España - Valores límite biológicos	
Nombre local	Isopropanol (Alcohol isopropílico)
España - VLB (Valores límite biológicos)	40 mg/l Parámetro: Acetona - Medio: Orina - Momento de muestreo: Final de la semana laboral - Notas: F (Fondo. El indicador está generalmente presente en cantidades detectables en personas no expuestas laboraboralmente. Estos niveles de fondo están considerados en el valor VLB), I (Significa que el indicador biológico es inespecífico puesto que puede encontrarse después de la exposición a otros agentes químicos)
Referencia normativa	Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España 2019. INSHT

Etanol; alcohol etílico (64-17-5)	
España - Valores límite de exposición profesional	
Nombre local	Etanol (Alcohol etílico)
VLA-EC (mg/m³)	1910 mg/m³
VLA-EC (ppm)	1000 ppm
Notas	s (Esta sustancia tiene prohibida total o parcialmente su comercialización y uso como fitosanitario y/o como biocida. Para una información detallada acerca de las prohibiciones consúltese: Base de datos de productos biocidas: http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/productos.do?tipo=plaguicidas Base de datos de productos fitosanitarios http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/Lista_sa.pdf).
Referencia normativa	Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España 2019. INSHT

d-Limonene (5989-27-5)	
España - Valores límite de exposición profesional	
Nombre local	d-Limoneno
VLA-ED (mg/m³)	168 mg/m³
VLA-ED (ppm)	30 ppm
Notas	Sen (Sensibilizante), vía dérmica (Indica que, en las exposiciones a esta sustancia, la aportación por la vía cutánea puede resultar significativa para el contenido corporal total si no se adoptan medidas para prevenir la absorción. En estas situaciones, es aconsejable la utilización del control biológico para poder cuantificar la cantidad global absorbida del contaminante).
Referencia normativa	Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España 2019. INSHT

Citral (5392-40-5)	
España - Valores límite de exposición profesional	
Nombre local	Citral
VLA-ED (ppm)	5 ppm
Notas	Vía dérmica (Indica que, en las exposiciones a esta sustancia, la aportación por la vía cutánea puede resultar significativa para el contenido corporal total si no se adoptan medidas para prevenir la absorción. En estas situaciones, es aconsejable la utilización del control biológico para poder cuantificar la cantidad global absorbida del contaminante), Sen (Sensibilizante), FIV (Fracción inhalable y vapor. La notación FIV señala a aquellos agentes químicos que se pueden presentar en el ambiente de trabajo, tanto en forma de materia particulada como vapor, por lo que las dos fases pueden coexistir, contribuyendo ambas a la exposición. Esta situación se puede dar, principalmente, en los siguientes casos: • Cuando el agente en cuestión tiene un valor “intermedio” de presión de vapor (en estos casos se tiene en cuenta la relación entre su concentración en el aire saturado de vapor y el valor del VLA-ED® y la nota se asigna, generalmente, cuando el cociente entre ambas cantidades se encuentra entre 0.1 y 10). • Por razón de la forma de uso del agente químico (por ejemplo, pulverización). • En los procesos que conlleven cambios importantes de temperatura que puedan afectar al estado físico del agente químico. • En los procesos en los que una fracción significativa del vapor puede disolverse o adsorberse en las partículas de otra sustancia, a semejanza de lo que ocurre con los agentes solubles en agua en ambientes con humedad elevada).
Referencia normativa	Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España 2019. INSHT

8.2. Controles de la exposición

Controles técnicos apropiados:
El puesto de trabajo ha de estar bien ventilado. Prever fuentes de emergencia para el lavado de ojos y duchas de seguridad en las áreas con riesgo de exposición.

Ropa de protección - selección del material:
Evitar el contacto con la piel. En caso de proyecciones fuertes, usar ropa de protección química estanca a los líquidos (tipo 3) conforme a la norma EN14605 para evitar cualquier contacto con la piel. En caso de riesgo de salpicaduras, usar ropa de protección química (tipo 6) conforme a la norma EN13034 para evitar cualquier contacto con la piel. La ropa del personal debe lavarse con regularidad. Lavar todas las zonas del cuerpo que hayan estado en contacto con el producto

Protección de las manos:					
La selección de los guantes se debe realizar según la aplicación y la duración del uso en el puesto de trabajo					
Tipo	**Material**	**Permeabilidad**	**Espesor (mm)**	**Penetración**	**Norma**
Guantes desechables, Guantes reutilizables					EN 374

Protección ocular:			
Evítese el contacto con los ojos. En caso de peligro acrecentado, utilizar una pantalla para proteger el rostro. El uso de gafas correctoras no constituye una protección. Se recomienda que los usuarios de lentes de contacto usen lentes correctivos cuando trabajen donde puedan estar expuestos a vapores irritantes. Implementar fuentes de lavado de ojos en los talleres donde el producto se manipula de forma constante			
Tipo	**Utilización**	**Características**	**Norma**
Gafas de seguridad		con protecciones laterales	EN 166

Protección de las vías respiratorias:
En caso de ventilación insuficiente, llevar equipo de protección respiratoria.

Símbolo/s del equipo de protección personal:

Control de la exposición ambiental:
Evitar su liberación al medio ambiente.

SECCIÓN 9: Propiedades físicas y químicas

9.1. Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

Forma/estado	:	Líquido
Apariencia	:	Claro.
Color	:	Azul.
Olor	:	Perfumes, fragancias.
Umbral olfativo	:	No hay datos disponibles
pH	:	3 – 7
Solución pH	:	3 – 7 (5% de dilución)
Velocidad de evaporación relativa (acetato de butilo=1)	:	No hay datos disponibles
Punto de fusión	:	No aplicable
Punto de solidificación	:	No hay datos disponibles
Punto de ebullición	:	No hay datos disponibles
Punto de inflamación	:	> 60 °C
Temperatura de autoignición	:	No hay datos disponibles
Temperatura de descomposición	:	No hay datos disponibles
Inflamabilidad (sólido, gas)	:	No aplicable
Presión de vapor	:	No hay datos disponibles
Densidad relativa de vapor a 20 °C	:	No hay datos disponibles
Densidad relativa	:	1,007 – 1,027
Solubilidad	:	No hay datos disponibles
Coeficiente de partición n-octanol/agua (Log Pow)	:	No hay datos disponibles
Viscosidad, cinemática	:	No hay datos disponibles
Viscosidad, dinámica	:	No hay datos disponibles
Propiedades explosivas	:	No hay datos disponibles
Propiedad de provocar incendios	:	No hay datos disponibles
Límites de explosión	:	No hay datos disponibles

9.2. Otros datos

No se dispone de más información

SECCIÓN 10: Estabilidad y reactividad

10.1. Reactividad

El producto no es reactivo en condiciones normales de utilización, almacenamiento y transporte.

10.2. Estabilidad química

Estable en condiciones normales.

10.3. Posibilidad de reacciones peligrosas

No se producen reacciones peligrosas conocidas en condiciones normales de utilización.

10.4. Condiciones que deben evitarse

Ninguna en las condiciones de almacenamiento y de manipulación recomendadas (véase la sección 7).

10.5. Materiales incompatibles

No se dispone de más información

10.6. Productos de descomposición peligrosos

En condiciones normales de almacenamiento y utilización, no deberían de generarse productos de descomposición peligrosos.

SECCIÓN 11: Información toxicológica

11.1. Información sobre los efectos toxicológicos

Toxicidad aguda (oral) : Nocivo en caso de ingestión.
Toxicidad aguda (cutánea) : No clasificado
Toxicidad aguda (inhalación) : Tóxico en caso de inhalación.

ALKACIDE	
ATE CLP (oral)	1123,596 mg/kg de peso corporal
ATE CLP (polvo, niebla)	0,588 mg/l/4 h

GLUTARAL (111-30-8)	
DL50 oral	285 mg/kg de peso corporal
DL50 cutánea rata	> 2000 mg/kg de peso corporal Animal: rat, Guideline: OECD Guideline 402 (Acute Dermal Toxicity)
DL50 cutáneo conejo	> 2000 mg/kg de peso corporal Animal: rabbit, Guideline: EPA OPP 81-2 (Acute Dermal Toxicity)
DL50 vía cutánea	> 2000 mg/kg de peso corporal
CL50 inhalación rata (niebla/polvo - mg/l/4h)	280 mg/l

Cloruro de didecildimetilamonio (7173-51-5)	
DL50 oral rata	329 mg/kg de peso corporal Animal: rat, Guideline: OECD Guideline 401 (Acute Oral Toxicity)
DL50 oral	329 mg/kg de peso corporal
DL50 cutánea rata	> 1000 mg/kg de peso corporal Animal: rat, Guideline: OECD Guideline 402 (Acute Dermal Toxicity), Guideline: EU Method B.3 (Acute Toxicity (Dermal))
DL50 vía cutánea	3342 mg/kg de peso corporal
CL50 inhalación rata (niebla/polvo - mg/l/4h)	70 mg/l

Corrosión o irritación cutáneas : Provoca quemaduras graves en la piel.
pH: 3 – 7
Lesiones oculares graves o irritación ocular : Provoca lesiones oculares graves.
pH: 3 – 7
Sensibilización respiratoria o cutánea : Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
Mutagenicidad en células germinales : No clasificado

Carcinogenicidad : No clasificado

Toxicidad para la reproducción : No clasificado

Toxicidad específica en determinados órganos (STOT) – exposición única : Puede irritar las vías respiratorias.

Toxicidad específica en determinados órganos (STOT) – exposición repetida : No clasificado

GLUTARAL (111-30-8)	
NOAEL (cutáneo, rata/conejo, 90 días)	150 mg/kg de peso corporal Animal: rat, Guideline: OECD Guideline 411 (Subchronic Dermal Toxicity: 90-Day Study), Guideline: EPA OPPTS 870.3250 (Subchronic Dermal Toxicity 90 Days)

Peligro por aspiración : No clasificado

SECCIÓN 12: Información ecológica

12.1. Toxicidad

Ecología - general : Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
Peligro a corto plazo (agudo) para el medio ambiente acuático : Muy tóxico para los organismos acuáticos.
Peligro a largo plazo (crónico) para el medio ambiente acuático : Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
No fácilmente degradable

GLUTARAL (111-30-8)	
CL50 peces 1	10 mg/l
CE50 otros organismos acuáticos 1	0,75 mg/l waterflea
CE50 otros organismos acuáticos 2	0,6 mg/l
NOEC (crónico)	5 mg/l Test organisms (species): Daphnia magna Duration: '21 d'

Cloruro de didecildimetilamonio (7173-51-5)	
CL50 peces 1	0,49 mg/l
CL50 peces 2	0,49 mg/l Test organisms (species): Danio rerio (previous name: Brachydanio rerio)
CE50 Daphnia 1	0,057 mg/l Test organisms (species): Daphnia magna
CE50 Daphnia 2	0,029 mg/l Test organisms (species): Daphnia magna
CE50 otros organismos acuáticos 1	0,057 mg/l waterflea
CE50 otros organismos acuáticos 2	0,156 mg/l
LOEC (crónico)	0,047 mg/l Test organisms (species): Daphnia magna Duration: '21 d'
NOEC (crónico)	0,021 mg/l Test organisms (species): Daphnia magna Duration: '21 d'

12.2. Persistencia y degradabilidad

ALKACIDE	
Biodegradación	> 87 % (OCDE 302 B - 28 días)

Cloruro de didecildimetilamonio (7173-51-5)	
Biodegradación	> 70 % (Activated Sludge) (OECD 301 D)

12.3. Potencial de bioacumulación

GLUTARAL (111-30-8)	
Coeficiente de partición n-octanol/agua (Log Pow)	-0,36

Cloruro de didecildimetilamonio (7173-51-5)	
Coeficiente de partición n-octanol/agua (Log Pow)	0,4

12.4. Movilidad en el suelo

No se dispone de más información

12.5. Resultados de la valoración PBT y mPmB

ALKACIDE
Esta sustancia/mezcla no cumple los criterios PBT del anexo XIII del reglamento REACH
Esta sustancia/mezcla no cumple los criterios mPmB del anexo XIII del reglamento REACH

Componente	
Cloruro de didecildimetilamonio (7173-51-5)	Esta sustancia/mezcla no cumple los criterios PBT del anexo XIII del reglamento REACH Esta sustancia/mezcla no cumple los criterios mPmB del anexo XIII del reglamento REACH

12.6. Otros efectos adversos

No se dispone de más información

SECCIÓN 13: Consideraciones relativas a la eliminación

13.1. Métodos para el tratamiento de residuos

Métodos para el tratamiento de residuos : Eliminar el contenido/recipiente de acuerdo con las instrucciones de reciclaje del recolector homologado.

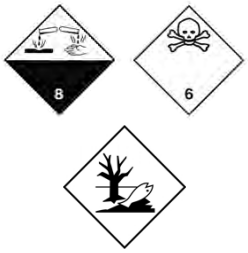
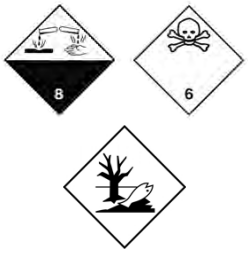
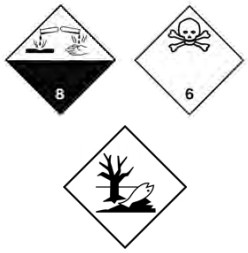
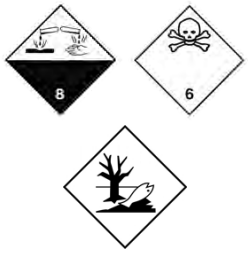
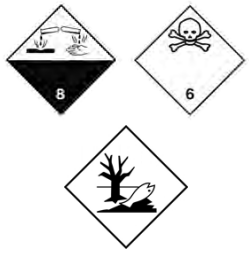
Recomendaciones para la eliminación de las aguas residuales : Eliminar de acuerdo con las prescripciones legales.

Recomendaciones para la eliminación de productos/envases : Vaciar completamente el envase. Conservar la(las) etiqueta(s) en el envase. Destruir cumpliendo las condiciones de seguridad exigidas por la legislación local/nacional. Evitar la entrada en sistemas de aguas pluviales o cursos de agua. La gestión de los residuos se realiza sin poner en peligro la salud humana y sin perjudicar el medioambiente, y en especial, sin crear riesgos para el agua, el aire, el suelo, la fauna o la flora.

SECCIÓN 14: Información relativa al transporte

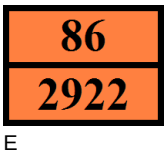
Según los requisitos de ADR / RID / IMDG / IATA / ADN

ADR	IMDG	IATA	ADN	RID
14.1. Número ONU				
UN 2922	UN 2922	UN 2922	UN 2922	UN 2922
14.2. Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas				
LÍQUIDO CORROSIVO, TÓXICO, N.E.P. (GLUTARAL ; Cloruro de didecildimetilamonio)	LÍQUIDO CORROSIVO, TÓXICO, N.E.P. (GLUTARAL ; Cloruro de didecildimetilamonio)	Corrosive liquid, toxic, n.o.s. (GLUTARAL ; Cloruro de didecildimetilamonio)	LÍQUIDO CORROSIVO, TÓXICO, N.E.P. (GLUTARAL ; Cloruro de didecildimetilamonio)	LÍQUIDO CORROSIVO, TÓXICO, N.E.P. (GLUTARAL ; Cloruro de didecildimetilamonio)

Descripción del documento del transporte				
UN 2922 LÍQUIDO CORROSIVO, TÓXICO, N.E.P. (GLUTARAL ; Cloruro de didecildimetilamonio), 8 (6.1), III, (E), PELIGROSO PARA EL MEDIOAMBIENTE	UN 2922 LÍQUIDO CORROSIVO, TÓXICO, N.E.P. (GLUTARAL ; Cloruro de didecildimetilamonio), 8 (6.1), III, CONTAMINANTE MARINO/PELIGROSO PARA EL MEDIOAMBIENTE	UN 2922 Corrosive liquid, toxic, n.o.s. (GLUTARAL ; Cloruro de didecildimetilamonio), 8 (6.1), III, PELIGROSO PARA EL MEDIOAMBIENTE	UN 2922 LÍQUIDO CORROSIVO, TÓXICO, N.E.P. (GLUTARAL ; Cloruro de didecildimetilamonio), 8 (6.1), III, PELIGROSO PARA EL MEDIOAMBIENTE	UN 2922 LÍQUIDO CORROSIVO, TÓXICO, N.E.P. (GLUTARAL ; Cloruro de didecildimetilamonio), 8 (6.1), III, PELIGROSO PARA EL MEDIOAMBIENTE
14.3. Clase(s) de peligro para el transporte				
8 (6.1)	8 (6.1)	8 (6.1)	8 (6.1)	8 (6.1)
				
14.4. Grupo de embalaje				
III	III	III	III	III
14.5. Peligros para el medio ambiente				
Peligroso para el medio ambiente : Sí	Peligroso para el medio ambiente : Sí Contaminante marino : Sí	Peligroso para el medio ambiente : Sí	Peligroso para el medio ambiente : Sí	Peligroso para el medio ambiente : Sí
No se dispone de información adicional				

14.6. Precauciones particulares para los usuarios

Transporte por vía terrestre

Código de clasificación (ADR)	:	CT1
Disposiciones especiales (ADR)	:	274
Cantidades limitadas (ADR)	:	5l
Cantidades exceptuadas (ADR)	:	E1
Instrucciones de embalaje (ADR)	:	P001, IBC03, R001
Disposiciones para el embalaje en común (ADR)	:	MP19
Instrucciones para cisternas portátiles y contenedores para granel (ADR)	:	T7
Disposiciones especiales para cisternas portátiles y contenedores para granel (ADR)	:	TP1, TP28
Código cisterna (ADR)	:	L4BN
Vehículo para el transporte en cisternas	:	AT
Categoría de transporte (ADR)	:	3
Disposiciones especiales de transporte - Bultos (ADR)	:	V12
Disposiciones especiales de transporte - Carga, descarga y manipulado (ADR)	:	CV13, CV28
Número de identificación de peligro (código Kemler)	:	86
Panel naranja	:	
Código de restricciones en túneles (ADR)	:	E

Transporte marítimo

Disposiciones especiales (IMDG)	:	223, 274

Cantidades limitadas (IMDG)	:	5 L
Cantidades exceptuadas (IMDG)	:	E1
Instrucciones de embalaje (IMDG)	:	P001
Instrucciones de embalaje GRG (IMDG)	:	IBC03
Instrucciones para cisternas (IMDG)	:	T7
Disposiciones especiales para las cisternas (IMDG)	:	TP1, TP28
N.° FS (Fuego)	:	F-A
N.° FS (Derrame)	:	S-B
Categoría de carga (IMDG)	:	B
Estiba y Manipulación (IMDG)	:	SW2
Propiedades y observaciones (IMDG)	:	Causes burns to skin, eyes and mucous membranes. Toxic if swallowed, by skin contact or by inhalation.

Transporte aéreo

Cantidades exceptuadas para aviones de pasajeros y de carga (IATA)	:	E1
Cantidades limitadas para aviones de pasajeros y de carga (IATA)	:	Y841
Cantidad neta máxima para cantidad limitada en aviones de pasajeros y de carga (IATA)	:	1L
Instrucciones de embalaje para aviones de pasajeros y de carga (IATA)	:	852
Cantidad neta máxima para aviones de pasajeros y de carga (IATA)	:	5L
Instrucciones de embalaje exclusivamente para aviones de carga (IATA)	:	856
Cantidad máx. neta exclusivamente para aviones de carga (IATA)	:	60L
Disposiciones especiales (IATA)	:	A3, A803
Código GRE (IATA)	:	8P

Transporte por vía fluvial

Código de clasificación (ADN)	:	CT1
Disposiciones especiales (ADN)	:	274, 802
Cantidades limitadas (ADN)	:	5 L
Cantidades exceptuadas (ADN)	:	E1
Equipo requerido (ADN)	:	PP, EP, TOX, A
Ventilación (ADN)	:	VE02
Número de conos/luces azules (ADN)	:	0

Transporte ferroviario

Código de clasificación (RID)	:	CT1
Disposiciones especiales (RID)	:	274
Cantidades limitadas (RID)	:	5L
Cantidades exceptuadas (RID)	:	E1
Instrucciones de embalaje (RID)	:	P001, IBC03, R001
Disposiciones particulares relativas al embalaje común (RID)	:	MP19
Instrucciones para cisternas portátiles y contenedores para granel (RID)	:	T7
Disposiciones especiales para cisternas portátiles y contenedores para granel (RID)	:	TP1, TP28
Códigos de cisterna para las cisternas RID (RID)	:	L4BN
Categoría de transporte (RID)	:	3
Disposiciones especiales de transporte - Bultos (RID)	:	W12
Disposiciones especiales relativas al transporte - Carga, descarga y manipulación (RID)	:	CW13, CW28
Paquetes exprés (RID)	:	CE8
N.° de identificación del peligro (RID)	:	86

14.7. Transporte a granel con arreglo al anexo II del Convenio MARPOL y el Código IBC

No aplicable

SECCIÓN 15: Información reglamentaria

15.1. Reglamentación y legislación en materia de seguridad, salud y medio ambiente específicas para la sustancia o la mezcla

15.1.1. UE-Reglamentos

No contiene sustancias sujetas a restricciones según el anexo XVII de REACH
No contiene ninguna sustancia incluida en la lista de sustancias candidatas de REACH
No contiene ninguna sustancia que figure en la lista del Anexo XIV de REACH
Sustancias sujetas al Reglamento (UE) nº 649/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo del 4 de julio de 2012, relativo a la exportación e importación de productos químicos peligrosos: Cloruro de didecildimetilamonio (7173-51-5)
No contiene ninguna sustancia sujeta al Reglamento (UE) nº 2019/1021 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de junio de 2019 sobre contaminantes orgánicos persistentes

15.1.2. Reglamentos nacionales

No se dispone de más información

15.2. Evaluación de la seguridad química

No se ha llevado a cabo la Evaluación de la Seguridad Química

SECCIÓN 16: Otra información

Indicación de modificaciones:
Composición/información sobre los componentes. Identificación de los peligros. Información relativa al transporte. Installations classées.

Abreviaturas y acrónimos:	
ADN	Acuerdo europeo relativo al transporte internacional de mercancías peligrosas por vías navegables interiores
ADR	Acuerdo europeo relativo al transporte internacional de mercancías peligrosas por carretera
ATE	Estimación de la toxicidad aguda
VLB (Valor Límite Biológico)	Valor límite biológico
N° CAS	número CAS
CLP	Reglamento (CE) nº 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado
DMEL	Nivel derivado con efecto mínimo
DNEL	Nivel sin efecto derivado
EC50	Concentración efectiva media
N° CE	número CE
EN	Norma europea
IATA	Asociación Internacional de Transporte Aéreo
IMDG	Código Marítimo Internacional de Mercancías Peligrosas
LC50	Concentración letal para el 50 % de una población de pruebas
LD50	Dosis letal para el 50 % de una población de pruebas (dosis letal media)
LOAEL	Nivel más bajo con efecto adverso observado
NOAEC	Concentración sin efecto adverso observado
NOAEL	Nivel sin efecto adverso observado
NOEC	Concentración sin efecto observado
VLA	Límite de exposición profesional
PBT	Sustancia persistente, bioacumulativa y tóxica

PNEC	Concentración prevista sin efecto
REACH	Registro, evaluación, autorización y restricción de las sustancias y preparados químicos Reglamento (CE) nº 1907/2006
RID	Reglamento relativo al transporte internacional de mercancías peligrosas por ferrocarril
FDS	Fichas de datos de seguridad
mPmB	Muy persistente y muy bioacumulable
WGK	Clase de peligro para el agua

Otros datos : Dado que no conocemos las condiciones de trabajo del usuario, las informaciones que figuran en la presente ficha de seguridad se basarán en el estado de nuestros conocimientos y en las normativas tanto nacionales como comunitarias. La mezcla no debe ser utilizada para otros usos que no sean los especificados en la sección 1 sin haber obtenido previamente instrucciones de manipulación por escrito. El usuario es totalmente responsable de tomar todas las medidas necesarias para responder a las exigencias de las leyes y normativas locales.

Texto íntegro de las frases H y EUH:	
Acute Tox. 2 (Inhalation)	Toxicidad aguda (por inhalación), categoría 2
Acute Tox. 3 (Oral)	Toxicidad aguda (oral), categoría 3
Acute Tox. 4 (Oral)	Toxicidad aguda (oral), categoría 4
Aquatic Acute 1	Peligroso para el medio ambiente acuático — Peligro agudo, categoría 1
Aquatic Chronic 2	Peligroso para el medio ambiente acuático — Peligro crónico, categoría 2
Eye Dam. 1	Lesiones oculares graves o irritación ocular, categoría 1
Resp. Sens. 1	Sensibilización respiratoria, categoría 1
Skin Corr. 1B	Irritación o corrosión cutáneas, categoría 1, subcategoría 1B
Skin Sens. 1A	Sensibilización cutánea, categoría 1A
STOT SE 3	Toxicidad específica en determinados órganos — Exposición única, categoría 3, irritación de las vías respiratorias
H301	Tóxico en caso de ingestión.
H302	Nocivo en caso de ingestión.
H314	Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
H318	Provoca lesiones oculares graves.
H330	Mortal en caso de inhalación.
H331	Tóxico en caso de inhalación.
H334	Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.
H335	Puede irritar las vías respiratorias.
H400	Muy tóxico para los organismos acuáticos.
H411	Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
H412	Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

SDS EU (Anexo II de REACH)

Esta información se basa en nuestro conocimiento actual y tiene como finalidad describir el producto para la tutela de la salud, seguridad y medio ambiente. Por lo tanto, no debe ser interpretada como garantía de ninguna característica específica del producto.

Alkacide®

Desinfectante tras limpieza desproteinizante con Alkazyme

Para la desinfección de alto nivel por inmersión

de los dispositivos médicos invasivos y no invasivos,

del instrumental quirúrgico,

de los endoscopios rígidos y flexibles

Noticia técnica

SODEL - ISO 9001/13485
190 rue René Barthélemy, Pôle d'activités de l'Espérance, 14100 Lisieux, France.
TEL: +33 (0)2 31 31 10 50.
www.sodel-sa.eu - www.alkapharm.fr

Índice

Declaración de conformidad ... 3
Presentación ... 4
Ámbito de utilización ... 4
Características ... 4
Presentaciones comerciales ... 4
Uso ... 5
Información reglamentaria ... 5
Limpieza preliminar con Alkazyme ... 6
Preparación de la solución de Alkacide ... 6
Modo de empleo ... 7
Conservación y renovación de la solución lista para usar ... 8
Precauciones de empleo ... 8
Manipulación - Puesta en servicio - Almacenamiento ... 8
Vertido accidental - Eliminación ... 9
Datos físico-químicos ... 10
Composición ... 10
Características físico-químicas ... 10
Tenor en pentano-1,5-dial de la solución diluida para su utilización ... 10
Datos microbiológicos ... 11
Ensayos de determinación de la actividad bactericida ... 11
Ensayos de determinación de la actividad fungicida ... 13
Ensayos de determinación de la actividad virucida ... 15
Ensayos de determinación de la actividad tuberculocida ... 19
Ensayos de determinación de la actividad esporicida ... 20
Datos toxicológicos y ecotoxicológicos ... 21
Toxicidad ... 21
Valor límite de exposición ... 22
Biodegradabilidad ... 23
Datos de compatibilidad ... 24
Certificados de compatibilidad ... 24

Tanto los informes de los ensayos de microbiología y toxicología, como las hojas de datos de seguridad se proporcionarán por separado, a pedido del interesado.

Declaración de conformidad

SODEL garantiza y declara que el producto Alkacide cumple los requisitos esenciales de la Directiva 93/42/CEE del 14 de junio de1993 relativa a los Dispositivos Médicos.

Este producto forma parte de la clase IIb, de conformidad con la regla 15 del Anexo IX de la Directiva 93/42/CEE modificada por el Directiva 2007/47/CE que define que "Todos los productos que se destinen específicamente a la desinfección de productos sanitarios se incluirán en la clase IIa, a no ser que estén destinados específicamente a la desinfección de productos invasivos, en cuyo caso se incluirán en la clase IIb".

SODEL declara que el producto Alkacide no contiene:

- ninguna sustancia derivada de sangre humana;
- ninguna sustancia que, utilizada por separado, pueda ser considerada como un medicamento, en el sentido del artículo 1º de la Directiva 2001/83/CE;
- tejidos de origen animal;
- ftalatos.

Presentación

Ámbito de utilización

Alkacide se utiliza para la desinfección final o la esterilización química por inmersión, previa limpieza predesinfectante con Alkazyme:

- de los dispositivos médicos reutilizables, invasivos y no invasivos, que no puedan ser esterilizados con los métodos tradicionales: material flexible y rígido de endoscopía para cavidades estériles y no estériles, sondas de ecografía transesofágica, sondas endocavitarias, resucitadores, etc.
- del instrumental quirúrgico: pinzas, trocares, etc.

Características

- Alkacide es una preparación desinfectante líquida a base de pentano-1,5-dial potencializado por tensioactivos.
- Alkacide es bactericida, fungicida, virucida, tuberculocida y eficaz contra las esporas de *Bacillus subtilis var niger*.
- Alkacide permite la desinfección de alto nivel tras limpieza desproteinizante con Alkazyme.

Presentaciones comerciales

Referencia	Envase	Caja
ALKE183	Botella de 1 L con cámara dosificadora	6 botellas

Uso

Información reglamentaria

- Como dispositivo médico de Clase IIb, el etiquetado de Alkacide cumple con los requisitos del anexo I de la Directiva 93/42/CEE. Incluye el manual de instrucciones y lleva el número de lote y la fecha de caducidad de cada fabricación, en la forma:

LOT XXXXXXXXXXXX

AAAA.MM

0

Produit : (01) ALKXXXX
Lot : (10) 6SXXNYYYY
DLU : (17) AAAAMM

- Toda la información sobre seguridad está reunida en la hoja de datos de seguridad consultable en el sitio web www.alkapharm.fr o disponible si se solicita previamente.
- Esta información es la que figura en la etiqueta del producto Alkacide.

Información reglamentaria conforme al reglamento (CE) n°1272/2008 y sus modificaciones	
Símbolos de peligro	
Palabra de advertencia	PELIGRO
Identificadores del producto	Contiene : GLUTARAL CLORURO DE DIDECILDIMETILAMONIO
Menciones de peligro	H302 Nocivo en caso de ingestión. H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H331 Tóxico en caso de inhalación. H334 Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. H335 Puede irritar las vías respiratorias. H410 Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
Consejos de prudencia	P261 Evitar respirar los vapores. P271 Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado. P280 Llevar guantes de protección, ropa de protección, equipo de protección para los ojos y la cara. P301+P330+P331+P310 EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagarse la boca. NO provocar el vómito. Llamar inmediatamente a un médico, un CENTRO DE TOXICOLOGÍA. P303+P361+P353+P310 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ducharse. Llamar inmediatamente a un médico, un CENTRO DE TOXICOLOGÍA. P304+P340+P311 EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar a un médico, un CENTRO DE TOXICOLOGÍA. P305+P351+P338+P310 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado. Llamar inmediatamente a un médico, un CENTRO DE TOXICOLOGÍA. P333+P313 En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. P342+P311 En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un médico, un CENTRO DE TOXICOLOGÍA. P391 Recoger el vertido. P501 Eliminar el contenido y el recipiente en un centro de recogida de residuos peligrosos o especiales, con arreglo a la normativa local, regional, nacional y/o internacional.

Limpieza preliminar con Alkazyme

- El dispositivo y sus accesorios deben abrirse, desmontarse y limpiarse previamente con el detergente desinfectante y desproteinizante Alkazyme, por inmersión, irrigación de los canales y partes huecas, y, si es necesario, cepillado. Acto seguido, el dispositivo se deberá aclarar abundantemente y dejar escurrir.
- Los ensayos de laboratorio realizados por el grupo GERMANDE (Grupo de Estudio e Investigación sobre Máquinas Automáticas de Limpieza y Desinfección de Endoscopios) y por los laboratorios CHEMILA e IRM demuestran la particular eficacia del protocolo de limpieza desinfectante desproteinizante enzimática Alkazyme en asociación con el protocolo de desinfección Alkacide.
- Después de la limpieza con Alkazyme a 0,5% 15 min, Alkacide efectúa una desinfección de alto nivel en sólo 15 minutos.

Actividad	Log	Tiempo	Concentración
Bactericida	5 log	15 min	1%
Fungicida	4 log	15 min	2%
Virucida	4 log	15 min	2%
Tuberculocida	6 log	15 min	2%
Esporas *Bacillus subtilis*	6 log	15 min	2%

Preparación de la solución de Alkacide

Dilución de la preparación de Alkacide

- Para realizar la preparación hará falta un recipiente de desinfección ALKAPHARM o un recipiente de desinfección graduado, así como de un escurridor y una tapa.
- La dilución se efectuará con agua de la red o, si es necesario, con agua microbiológicamente controlada, a temperatura ambiente.
- En los envases de un litro, la dosificación con la cámara dosificadora se efectúa presionando los costados de la botella. El líquido sube hasta la cámara dosificadora. Al soltar la presión, el líquido sobrante vuelve a descender al envase.

	Alkacide 2% *(desinfección de alto nivel)*
Botella dosificadora 1L	1 dosis de 20 ml para cada litro de solución

Incompatibilidades de Alkacide

- La solución Alkacide diluido no podrá mezclarse con otros productos de limpieza o desinfección.

Modo de empleo

Inmersión

- Después de una limpieza con Alkazyme (0,5%, 15 min), comprobar que los dispositivos médicos y instrumentos médico-quirúrgicos estén bien enjuagados y escurridos.
- Los instrumentos médico-quirúrgicos y los dispositivos médicos deben sumergirse completamente en la solución de Alkacide diluido.
- El operador debe asegurarse de que las cavidades, los canales de los dispositivos así como las partes huecas o complejas estén en contacto o irrigadas por la solución de Alkacide diluido.
- Una vez concluido el tiempo de contacto recomendado, los dispositivos se escurrirán en un escurridor.

Tiempo de contacto con Alkacide		
■ Desinfección alto nivel:	2%	15 min.

Aclarado

- El aclarado exterior y la irrigación interior han de ser abundantes y realizarse con agua microbiológicamente controlada para los dispositivos médicos destinados a las cavidades no estériles y con agua estéril para los dispositivos médicos destinados a las cavidades estériles. En este último caso, se deberán usar guantes estériles.

Agua de aclarado	
■ Cavidades no estériles:	Agua microbiológicamente controlada
■ Cavidades estériles:	Agua estéril / Guantes estériles

Secado

- El secado exterior se efectuará con:
  - una tela no tejida, en el caso de los dispositivos médicos destinados a las cavidades no estériles;
  - una tela no tejida estéril y guantes estériles en el caso de los dispositivos médicos destinados a las cavidades estériles.
- El secado de las partes huecas o complejas se llevará a cabo insuflando aire sanitario microbiológicamente puro.

Reutilización del dispositivo médico tras la desinfección

- La reutilización deberá ser inmediata.
- En caso de utilización diferida, el almacenamiento del dispositivo deberá hacerse en condiciones microbiológicamente controladas.

Desinfección reiterada

- Después de 12 horas de almacenamiento, es necesario volver a realizar la operación completa de desinfección por inmersión en la solución de Alkacide según la metodología seleccionada y aclarar y secar de conformidad con las condiciones definidas.

Conservación y renovación de la solución lista para usar

- El recipiente que contenga la solución lista para usar deberá mantenerse cubierto en un lugar fresco y bien ventilado para limitar las emanaciones de pentano-1,5-dial.
- La solución debe mantenerse limpia y clara para garantizar la eficacia antimicrobiana.
- En buenas condiciones de uso (dispositivos médicos limpios, enjuagados y escurridos antes de la desinfección), la solución se conserva hasta 30 días. Renovarla tan pronto como esté visiblemente sucia o turbia.

Conservación de la solución
■ Conservación hasta 30 días

Informe de ensayo n° 001-REA-11 ST
Scientis laboratorio

- El recipiente de desinfección deberá ser limpiado, desinfectado y secado cada vez que se cambie la solución.

Precauciones de empleo

- La preparación y utilización de la solución lista para usar requieren el uso de guantes y de ropa de protección adecuada.
- Una utilización sin la necesaria precaución podría causar irritaciones en la piel y los ojos y una sensibilización respiratoria.
- Las proyecciones de Alkacide en los ojos pueden producir lesiones graves.

Manipulación - Puesta en servicio - Almacenamiento

- Alkacide se deberá conservar en su embalaje y con el etiquetado original, que describe el modo de uso y las precauciones de empleo y seguridad.
- Alkacide se almacenará bien cerrado, en un lugar seco, protegido de la humedad y lejos de cualquier fuente de calor que favorezca las emanaciones de pentano-1,5-dial al abrir el envase.
- Si el producto, en condiciones accidentales y durante un tiempo prolongado estuviese a proximidad de una fuente intensa de calor, es preferible que no se vuelva a utilizar, ya que sus cualidades, propiedades y características podrían haberse deteriorado.
- La caducidad de Alkacide es de 35 meses a partir de la fecha de fabricación.

Fecha de caducidad
35 meses después de la fecha de fabricación, indicada en la etiqueta de la siguiente manera: AAAA.MM (Año-Mes)

- Cierre el envase inmediatamente después del uso para que se conserven las cualidades, propiedades y características de Alkacide.

Vertido accidental - Eliminación

- Es necesario recuperar con precaución el contenido de los envases dañados y eliminar los recipientes y materias sólidas en un centro autorizado.
- Eliminar el contenido como un residuo peligroso. Después del enjuague con agua, eliminar el recipiente como un residuo no peligroso bajo la plena responsabilidad del titular de los residuos.
- El producto vertido se deberá recuperar con un soporte inerte y lavarse a continuación con abundante agua.

Datos físico-químicos

Composición

Alkacide
Pentano-1,5-dial purificado, Tensioactivos no iónicos y catiónicos, perfume, colorante.

Características físico-químicas

Aspecto	Líquido azul claro
Olor	Manzana
Densidad	1,017 +/- 0,010
pH de ALKACIDE Concentrado	5,0 ± 2,0

Tenor en pentano-1,5-dial de la solución diluida para su utilización

- Alkacide diluido al 2% contiene 0,170% de pentano-1,5-dial.

Datos microbiológicos

Ensayos de determinación de la actividad bactericida

Norma NF EN 13727 (julio de 2004)

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus* *Enterococcus hirae*
Sustancias interferentes:	Condiciones de limpieza: albúmina bovina a 0,3 g/l final en el ensayo
Tiempo de contacto:	15 minutos +/- 10 seg.
Temperatura:	20°C +/- 1°C
Concentración:	0,25%

Informe de ensayo n° RE 600/1004/M-1 del 03/08/2005
I.R.M. - Institut de Recherche Microbiologique (Instituto de Investigación Microbiológica)

Conclusión: El producto ALKACIDE es un bactericida de conformidad con la norma europea NF EN 13727 (julio de 2004), a los 15 minutos de contacto a 20ºC en presencia de albúmina a 0,3 g/l al final durante los ensayos (condiciones de limpieza) en las cepas de referencia *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103 467, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 y *Enterococcus hirae* CIP 5855 con una concentración de 0,25% (v/v).

Norma NF EN 14561 (marzo de 2007) adaptada a soportes inoxidables

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Pseudomonas aeruginosa,* *Staphylococcus aureus,* *Enterococcus hirae*
Sustancias interferentes:	Condiciones de limpieza: albúmina bovina a 0,3 g/l
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C
Concentración:	1%

Informe de ensayo n° 130-1REA10 del 11/10/2010
Laboratorio SCIENTIS

Conclusión: El producto ALKACIDE, lote 2007.10.01.63, cumple con la metodología de la norma EN 14561 adaptada a soportes inoxidables. Presenta una actividad bactericida con una concentración del 1%, en presencia de condiciones de limpieza, a 20°C y a los 15 minutos de contacto.

Norma NF EN 14561 (marzo de 2007) adaptada a soportes inoxidables

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Acinetobacter baumannii*
Sustancias interferentes:	Condiciones de limpieza: albúmina bovina a 0,3 g/l
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C
Concentración:	1%

Informe de ensayo n° 017-1REA11 del 21/03/2011
Laboratorio SCIENTIS

Conclusión: El producto ALKACIDE, lote 2009.06.0270, cumple con la metodología de la norma EN 14561 adaptada a soportes inoxidables. Presenta una actividad bactericida en la cepa *Acinetobacter baumannii* con una concentración del 1%, en presencia de condiciones de limpieza, a 20°C y a los 15 minutos de contacto.

Estudio del germen-portador según la metodología de la norma NF T 72-281 (Mayo de 2009)

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem (PARI)
Sustancias interferentes:	Condiciones de suciedad: 3,0 g/L de albúmina bovina y 3,0 mL/L de eritrocitos de oveja, para el paso de limpieza con ALKAZYME
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	18-25°C
Concentración:	2%

Informe de ensayo n° 288/0612-2 del 24/09/2012
Laboratorio IRM

Conclusión: No se ha encontrado ningún microorganismo superviviente a las cepas *Staphylococcus aureus* MICR 103.811, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem (PARI) CIP 105.521, en los soportes limpiados con el producto ALKAZYME (0,5%, 15 minutos) y desinfectados luego con el producto ALKACIDE (2%, 15 minutos) siguiendo el protocolo, ya sea plano o tubular, acero inoxidable o plástico.

Ensayos de determinación de la actividad fungicida

Norma NF EN 13624 (abril de 2004)

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Candida albicans*
Sustancias interferentes:	Condiciones de suciedad: 3g/L de albúmina bovina y eritrocitos de oveja 3g/L
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C
Concentración:	0,1%

Informe de ensayo n° n°009-1REA08 CI1 del 21/07/2010
Laboratorio SCIENTIS

Conclusión: El producto ALKACIDE cumple con la norma NF EN 13624. Presenta una actividad levuricida en condiciones de suciedad, a 20ºC y a los 15 minutos de contacto con la concentración del 0,1% (v/v).

Norma EN 14562 (septiembre de 2006) adaptada en soportes inoxidables

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Candida albicans*
Sustancias interferentes:	Condiciones de limpieza: albúmina bovina a 0,3 g/L
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C
Concentración:	2%

Informe de ensayo n° 131-1REA10 del 23/09/2010
Laboratorio SCIENTIS

Conclusión: El producto ALKACIDE, lote 2007.10.01.63, cumple con la metodología de la norma EN 14562 adaptada en soportes inoxidables. Presenta una actividad levuricida en la cepa *Candida albicans* con una concentración del 2% en presencia de condiciones de limpieza, a 20°C y a los 15 minutos de contacto.

Estudio del germen-portador según la metodología de la norma NF T 72-281 (Mayo de 2009)

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Aspergillus brasiliensis*
Sustancias interferentes:	Condiciones de suciedad: 3,0 g/L de albúmina bovina y 3,0 mL/L de eritrocitos de oveja, para el paso de limpieza con ALKAZYME
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	18-25°C
Concentración:	2%

Informe de ensayo n° 288/0612-1 del 24/09/2012
Laboratorio IRM

Conclusión: No se ha encontrado ningún microorganismo superviviente a la cepa *Aspergillus brasiliensis* DSM 1988 en los soportes limpiados con el producto ALKAZYME (0,5%, 15 minutos) y desinfectados luego con el producto ALKACIDE (2%, 15 minutos) siguiendo el protocolo, ya sea plano o tubular, acero inoxidable o plástico.

Tampoco se ha encontrado ningún microorganismo superviviente en el baño de desinfección que contenía ALKACIDE (2%).

Ensayos de determinación de la actividad virucida

Norma NF EN 14476+A1 (enero de 2007) en Adenovirus

Condiciones del ensayo	
Cepas:	Adenovirus de tipo 5
Sustancias interferentes	Condiciones de limpieza: albúmina bovina a 0,3 g/L
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C +/- 1°C
Concentración:	2% y 5%

Informe de ensayo n°053V47-2011 del 09/05/2011
Laboratorio APEX

Conclusión: Los ensayos realizados con el producto ALKACIDE demostraron que el producto ALKACIDE utilizado al 2% y 5% tiene una actividad virucida sobre el Adenovirus, en aplicación de la metodología de la norma NF EN 14476+A1, a los 15 minutos de contacto a 20°C, en condiciones de limpieza.

Norma NF EN 14476+A1 (enero de 2007) en Poliovirus

Condiciones del ensayo	
Cepas:	Poliovirus de tipo 1
Sustancias interferentes	Condiciones de limpieza: albúmina bovina a 0,3 g/L
Tiempo de contacto:	5 minutos
Temperatura:	20°C +/- 1°C
Concentración:	2%

Informe de ensayo n°A10ML1149-1Po del 06/05/2011
Laboratorio MIKROLAB

Conclusión: El desinfectante ALKACIDE se utilizó a 2,0% y 5,0% a 20 ° C en 5, 15 y 60 minutos de tiempo de contacto. Después de 5 minutos (solución al 2,0%) se observó una reducción en el título del virus ≥ cuatro unidades $\log_{10}$. La eficiencia se obtiene así con ALKACIDE: condiciones de limpieza 2,0% 5 minutos.

Norma UNI EN 14476 (octubre de 2013) en el virus de la hepatitis B y Norovirus

Condiciones del ensayo	
Cepa:	Pseudorabies virus - PRV (modelo de virus de la hepatitis B) Norovirus murino
Sustancias interferentes:	Condiciones de limpieza: albúmina bovina a 0,3 g/L
Tiempo de contacto:	15 minutes +/- 10 seg.
Temperatura:	20°C +/- 1°C
Concentración:	2% y 5%

Informe de ensayo n° 15/000275107 del 31/07/2015
CHELAB SILLIKER

Conclusión: Según la norma UNI EN 14476: 2013, el producto ensayado ALKACIDE cuando se utiliza al 2% o al 5%, tiene una actividad virucida (R≥4) bajo las siguientes condiciones: 15 minutos +/- 10 segundos de contacto, a una temperatura de 20ºC +/- 1°C, en condiciones limpieza (albúmina bovina 0,3 g/L), sobre virus: Norovirus murino y PRV (modelo HBV).

Norma NF EN 14476+A1 (enero de 2007) en el virus Herpes simplex de tipo 1

Condiciones del ensayo	
Cepa:	Herpes simplex de tipo 1
Sustancia interferente:	Condiciones de limpieza: albúmina bovina a 0,3 g/L
Tiempo de contacto:	1, 5, 15 y 60 minutos
Temperatura:	20°C +/- 1°C
Concentración:	0,5%

Informe de ensayo n° A10ML1149-1H del 20/01/2011
Mikrolab

Conclusión: El desinfectante ALKACIDE se utilizó a 0,5% y 2,0% a 20°C, a 1, 5, 15 y 60 minutos de tiempo de contacto. Después de un minuto se observó una reducción en el título del virus ≥ cuatro unidades $\log_{10}$. La eficacia se obtiene así con ALKACIDE: 0,5% 1 minuto.

Norma NF EN 14476+A1 (enero de 2007) en el Rotavirus

Condiciones del ensayo	
Cepa:	Rotavirus humano
Sustancia interferente:	Condiciones de limpieza: albúmina bovina a 0,3 g/L
Tiempo de contacto:	1 minuto
Temperatura:	20°C +/- 1°C
Concentración:	0,5%

Informe de ensayo n° A10ML1149-1R del 30/01/2011
Mikrolab

Conclusión: El desinfectante ALKACIDE se utilizó a 0,05% y 0,5% a 20°C, a 1, 5 y 15 minutos de tiempo de contacto. Después de un minuto se observó una reducción en el título del virus ≥ cuatro unidades log_{10}. La eficacia se obtiene así con ALKACIDE: 0,5% 1 minuto.

Norma NF EN 14476 (septiembre de 2013) en el virus de la Hepatitis C

Condiciones del ensayo	
Cepa:	BVDV (virus modelo HCV)
Sustancias interferentes:	Condiciones de limpieza: albúmina bovina a 3g/L
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C +/- 1°C
Concentración:	2%

Informe de ensayo n°041V03-2014-02 del 20/06/2014
Laboratorio APEX

Conclusión: Los ensayos realizados sobre el producto ALKACIDE, Lote Nº 2011.07.01.61, han demostrado que el producto ALKACIDE utilizado al 2,0% tenía actividad virucida sobre el virus de la hepatitis C (virus BVDV), de acuerdo con la metodología de la norma NF EN 14476, durante 15 minutos de contacto a 20°C, bajo condiciones de limpieza.

Ensayos sobre el virus VIH-1 en presencia de una sustancia interferente

Condiciones del ensayo	
Cepa:	HTLV $_{III}$ B
Sustancia interferente:	Suero de ternera al 10%
Tiempo de contacto:	5, 10 y 15 minutos
Temperatura:	20°C
Concentración:	0,5%

Informe de ensayo del 07/06/1993
Instituto Pasteur de Lille - Dr Krembel.

Conclusión: Habida cuenta del estudio conjugado de la transcriptasa inversa y del poder infeccioso residual, concluimos que el desinfectante ALKACIDE es activo en el virus VIH cuando se emplea al 0,5% durante 5, 10 y 15 minutos.

Norma UNI EN 17111 (enero 2019) en el Adenovirus, Norovirus y virus de la Vaccinia

Condiciones del ensayo	
Cepa:	Adenovirus de tipo 5 Norovirus murino MNV Vaccinia virus, cepa Ankara
Sustancia interferente:	Condiciones de limpieza: albúmina bovina a 3% (p/v)
Tiempo de contacto:	15 minutos +/- 10 seg.
Temperatura:	20°C +/- 1°C
Concentración:	1%, 2% y 5%

Informe de ensayo n° 20/000028558 del 14/01/2020
CHELAB SRL

Conclusión: De acuerdo con la norma UNI EN 17111: 2019, el producto analizado Alkacide (F1400), lote F1400190917A, tiene actividad virucida (R≥4) sobre los virus Adenovirus, Norovirus murino y Virus de la Vaccinia en las siguientes condiciones: al dilución al 1%, 2% y 5%, en 15 minutos +/- 10 seg de contacto, a una temperatura de 20°C +/- 1°C, en condiciones limpias.

Nota : El virus de la Vaccinia es el virus representativo de los virus envueltos presentados en los anexos a las normas EN 14476+A2 (2019), EN 16777 y EN 17111 como por ejemplo: virus de lahepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC); virus de inmunodeficiencia humana (VIH); Herpesviridae (virus del herpes); Coronavirus; Influenza, rabia, rubéola, virus del sarampión; ...

Ensayos de determinación de la actividad tuberculocida

Estudio del germen-portador según la metodología de la norma NF T 72-281 (Mayo de 2009)

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Mycobacterium terrae*
Sustancias interferentes:	Condiciones de suciedad: 3,0 g/L de albúmina bovina y 3,0 mL/L de eritrocitos de oveja, para el paso de limpieza con ALKAZYME
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	18-25°C
Concentración:	2%

Informe de ensayo n° 373/0912-1 del 11/03/2013
Laboratorio IRM

Conclusión: No se ha encontrado ningún microorganismo superviviente a la cepa *Mycobacterium terrae* CIP 104 321 en los soportes limpiados con el producto ALKAZYME (0,5%, 15 minutos) y desinfectados luego con el producto ALKACIDE (2%, 15 minutos) siguiendo el protocolo descrito, ya sea plano o tubular, acero inoxidable o plástico, contrariamente a los soportes de control donde casi 2 log todavía están presentes en los soportes.

Ensayos de determinación de la actividad esporicida

Estudio del germen-portador según la metodología de la norma NF T 72-281 (Mayo de 2009)

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Bacillus subtilis*
Sustancias interferentes:	Condiciones de suciedad: 3,0 g/L de albúmina bovina y 3,0 mL/L de eritrocitos de oveja, para el paso de limpieza con ALKAZYME
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	18-25°C
Concentración:	2%

Informe de ensayo n° 288/0612-1 del 24/09/2012
Laboratorio IRM

Conclusión: No se ha encontrado ningún microorganismo superviviente a las cepas *Staphylococcus aureus* MICR 103.811, *Aspergillus brasiliensis* DSM 1988 y *Bacillus subtilis* CIP 52.62 en los soportes limpiados con el producto ALKAZYME (0,5%, 15 minutos) y desinfectados luego con el producto ALKACIDE (2%, 15 minutos) siguiendo el protocolo, ya sea plano o tubular, acero inoxidable o plástico.

Tampoco se ha encontrado ningún microorganismo superviviente en el baño de desinfección que contenía ALKACIDE (2%).

Estudio sobre fibroscopios según el método de la norma NF T 72-231

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Bacillus subtilis* var *niger*
Sustancias interferentes:	Condiciones reales
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C
Concentración:	2%

Informe de ensayo del 03/04/1997
Laboratorio GERMANDE

Conclusión: Los resultados de este estudio muestran que el protocolo de limpieza de los fibroscopios digestivos propuesto por la empresa SODEL, que utiliza los productos Alkazyme 0,5% y Alkacide 2% durante 15 minutos cada uno es eficaz (con una reducción final superior a 6 log).

Datos toxicológicos y ecotoxicológicos

Toxicidad

Toxicidad aguda por ingestión según la línea directriz 401 de la OCDE

Alkacide
■ DL50 > 1600 mg/kg (1590 – 2038 mg/kg) ■ Nocivo por ingestión

Informe de ensayo n° T267/4545 del 23/08/1994
EVIC-CEBA

Alkacide diluido al 5%
■ DL50 >20 ml/kg ■ Preparación no peligrosa para la ingestión

Informe de ensayo n°T268/4545 del 2 de agosto de 1994
EVIC-CEBA

Conclusión: Según la Directiva 67/548/CEE, la preparación ALKACIDE 5% en agua destilada debe clasificarse entre las sustancias no peligrosas en caso de ingestión.

Efecto agudo irritante / corrosivo sobre la piel según la línea directriz 404 de la OCDE

Alkacide
■ Corrosivo para la piel ■ Riesgo de quemaduras

Informe de ensayo n° 303/5089 del 02/08/1994
EVIC-CEBA

Alkacide diluido al 5%
■ Preparación no irritante para la piel

Informe de ensayo n°T307/5089 del 2 de agosto de 1994
EVIC-CEBA

Conclusión: Según la Directiva 67/548/CEE, la preparación ALKACIDE 5% en agua destilada debe considerarse como no irritante para la piel.

Efecto agudo irritante / corrosivo en los ojos según la línea directriz 405 de la OCDE

Alkacide
■ Irritación de los ojos ■ Riesgos de lesiones oculares graves

Informe de ensayo n°T304/5089 del 05/07/1994
EVIC-CEBA

Alkacide diluido al 5%
■ Preparación no irritante para los ojos

Informe de ensayo n° T308/5089 del 02/08/1994
EVIC-CEBA

Conclusión: Según la Directiva 67/548/CEE, la preparación ALKACIDE 5% en agua destilada debe considerarse como no irritante para los ojos.

Evaluación del potencial de sensibilización cutánea en los animales de laboratorio según la línea directriz 406 del OCDE

Alkacide diluido al 5%
■ Preparación no sensibilizante para la piel

Informe de ensayo n° Te 772b / 98-4557 del 10/02/1999
EVIC-CEBA

Conclusión: Habida cuenta de los criterios de valoración adoptados, la preparación ALKACIDE 5% se ha clasificado como no sensibilizante al entrar en contacto con la piel (clase 1).

Valor límite de exposición

Evaluación de las emanaciones de pentano-1,5dial sobre un recipiente de solución diluida de ALKACIDE al 5%

Alkacide diluido al 5%
■ 0,04 – 0,06 ppm para una exposición de 15 min.

Informe de ensayo n°96141 del 12/12/1996
ACS Europe Advanced Chemical Sensors Co

Conclusión: Las concentraciones encontradas están muy por debajo de los valores límite de exposición (Ministerio de Trabajo francés) fijados en 0,2 ppm durante 15 minutos. A modo de información, el umbral de olor de pentano-1,5-dial se siente a aproximadamente 0,04 ppm.

Biodegradabilidad

Determinación de la biodegradabilidad intrínseca aerobia - Determinación de la desaparición del DOC (Zahn-Wellens) de acuerdo con la línea directriz 302B de la OCDE

Alkacide diluido al 5%
■ Preparación completamente biodegradable

Informe de ensayo n°RN05-10014.001 del 16/01/2006
Laboratorio SGS

Conclusión: La línea directriz de la OCDE establecen un umbral del 20% para la biodegradación más allá del cual la sustancia se considera intrínsecamente biodegradable y un umbral del 70% más allá del cual la sustancia se considera totalmente biodegradable. Para este análisis, la biodegradación de la sustancia de ensayo fue superior al 70% en 28 días (87%).

Por lo tanto, la muestra de ALKACIDE es "totalmente biodegradable" según los criterios de la OCDE.

Datos de compatibilidad

A la vista de los estudios de compatibilidad con el material y del balance de la experiencia del producto, Alkacide diluido al 2% se considera compatible con: el acero inoxidable, el policarbonato, el polietileno, el polipropileno, EEK, EDPM, FPM/FKM, PTFE, y la poliamida.

Certificados de compatibilidad

Hospitales:

- Clínica Saint Jean Languedoc (Francia): «Los endoscopios se sumergen en este producto y no he constatado nunca degradación alguna en los dispositivos médicos termosensibles relacionada con la utilización de este producto. El producto se utiliza diariamente en el centro de endoscopía, donde se realizan entre 60 y 80 endoscopías al día».

Fabricante de endoscopios:

- Storz: «Podemos concluir que el producto ALKAZYME, aplicado en las condiciones de ensayo, no es corrosivo para las partes metálicas y no es agresivo para los elementos ópticos y las diferentes partes plásticas, colas y soldaduras del material quirúrgico probado».
- Pentax: «Confirmamos que le producto ALKACIDE no ha presentado inconveniente alguno para los endoscopios PENTAX en los diferentes centros de utilización, incluidos nuestros talleres de servicio al cliente».

Fabricante de sondas:

- Siemens-Acuson: «ALKACIDE figura en la lista de productos aprobados por Siemens-Acuson para la limpieza de las sondas externas, endocavitarias y transesofágicas».
- Hitachi: «ALKACIDE es compatible con las sondas de ecografía de la marca Hitachi».
- Kretz: «Por la presente confirmamos que las sondas de ecografía Kretz utilizadas en sus servicios son compatibles con el método de desinfección preconizado por SODEL (ALKACIDE)».
- Quantel: «Ninguno de los ensayos realizados ha revelado ninguna anomalía o fallo en los ecógrafos. El desmontaje de las sondas y su análisis no ha puesto en eviencia ningún signo de deterioro de los circuitos».
- Medtronic: «Le confirmamos que el producto ALKACIDE puede utilizarse en las sondas GAELTEC que nosotros comercializamos».

Otros:

- Sopro: «ALKACIDE es compatible con la descontaminación de las cámaras de endoscopía».
- ABS: «Por la presente, le confirmamos nuestro acuerdo para la utilización del producto de detersión o limpieza ALKACIDE con nuestra gama de catéteres de manometría esofágica y anorrectal».

TITLE: Evaluation of the bactericidal activity of a couple of disinfectants using a method based on EN 14561:2006

Sample ID:	*20.507780.0001*
Description:	*Product for solution A:F1092 (lot: (10)9S12N1285 - Exp 02/2022* *Product for Solution B: F1400 (lot(10) 9S17N2181 Exp 03/2022*
Ref. AR:	*2013/289/D/Chapter 21*
Starting date:	*10/03/2020*
Report emission date:	*25/05/2020*
Prepared by:	*Lelia Vecchio*

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

SUMMARY

1 Abstract of results 3
2 Aim of the Method 3
3 Materials and Equipment 3
3.1 Material 3
3.2 Instruments 5
4 Procedure 5
4.1 Preparation of test organism suspensions and test solutions 5
4.2 Test Procedure 6
4.3 Acceptance Criteria 9
5 Results 9
5.1 Test performed with the freshly prepared A solution and B solution. 9
5.2 Test performed with the freshly prepared A solution and 30 days old B solution. 9
5.3 Calculation of Nw and R values. 10
6 Conclusions 11

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

1 ABSTRACT OF RESULTS

The modified EN 14561 method demonstrate that the couple of disinfectants F1092 and F1400, used together, with a rinsing step between them, have bactericidal activity against Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 when used in the conditions described in the test.

2 AIM OF THE METHOD

The aim of this test method is to test the efficacy of 2 chemical disinfectants applied over the surface of a frosted glass carrier one after the other, with a rinsing step in the middle.

3 MATERIALS AND EQUIPMENT

3.1 Material

3.1.1 Water

Free from substances that are toxic or inhibiting to the bacteria. It is freshly distilled water, not demineralized, sterilized at 121 °C for 15 minutes.

3.1.2 Hard Water for Dilution of Product (HW)

In a volumetric flask were placed 600 ml of sterile water and added:

Solution A	6 ml
Solution B	8 ml
Water	up to 1000 ml

pH 7.0 ± 0.2

The solution has been used within 12 hours.

3.1.3 Solution A

$MgCl_2$	19.84 g
$CaCl_2$	46.24 g
Water	up to 1000 ml

Sterilized by passing through a filter with a maximum effective pore size of 0.45 µm, stored at 2-8 °C for a maximum holding time of one month.

3.1.4 Solution B

$NaHCO_3$	35.02 g
Water	up to 1000 ml

Sterilized by passing through a filter with a maximum effective pore size of 0.45 µm, stored at 2-8 °C for a maximum holding time of 7 days.

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

3.1.5 *Diluent (Maximum Recovery Diluent, MRD)*

Tryptone sodium chloride solution consisting of:

Tryptone, pancreatic digest of casein	1 g
Sodium chloride	8,5 g

pH 7,0 ± 0.2. Sterilize at 121 °C for 15 minutes, store at room temperature for a maximum holding time of three months.

3.1.6 *Tryptone Soya Agar (TSA)*

Tryptone, pancreatic digest of casein	15 g
Soya peptone	5 g
Sodium chloride	5 g
Agar	15 g

pH 7,2 ± 0.2. Supplied ready to use, if not, sterilize at 121°C for 15 minutes, store at room temperature for a maximum holding time of three months.

3.1.7 *Neutralizer*

Lecithin	3 g/l
Tween 80	30 g/l
Sodium thiosulphate	5 g/l
L-Histidine	1 g/l
Saponine	30 g/l

In phosphate buffer 1%. Sterilize at 121°C for 15 minutes, store at room temperature for a maximum holding time of three months.

3.1.8 *Rinsing solution*

Tween 80	5 g/l

Sterilize at 121 °C for 15 minutes, store at room temperature for a maximum holding time of three months.

3.1.9 *Interfering substance (clean conditions)*

Bovine albumin	0.3 g
Water	100 ml

Sterilize by passing through a filter with a maximum effective pore size of 0.45 μm, store at 2-8 °C for a maximum holding time of one month. The final concentration of bovine albumin in the test procedure is 3 g/l.

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

3.1.10 Microbial strain

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442

3.2 Instruments

3.2.1 Stopwatch

3.2.2 Graduated pipettes of nominal capacities 10 ml, 5 ml, 2 ml, 1 ml

3.2.3 Water bath 45 °C ± 1 °C

3.2.4 Water bath 20 °C ± 1 °C

3.2.5 Incubator 36 °C ± 1 °C

3.2.6 Refrigerator 5 °C ± 3 °C

3.2.7 Analytical balance

3.2.8 pH-meter

3.2.9 Vortex® mixer

3.2.10 Spectrophotometer

3.2.11 Container: test tubes or flasks of suitable capacity

3.2.12 Glass beads (diameter 3 mm to 4 mm)

3.2.13 Class II safety cabinet

3.2.14 Volumetric flasks

3.2.15 Membrane filtration apparatus

3.2.16 Frosted glass carriers, 15 mm x 60 mm x 1 mm. One surface sandblasted.

3.2.17 Petri dishes (diameter 90 mm)

3.2.18 Usual microbiological laboratory equipment

All glassware and parts of the apparatus that came in contact with the culture media and reagents or the sample (except those which are supplied sterile) shall be sterilized at 121°C for 15 minutes.

4 PROCEDURE

4.1 Preparation of test organism suspensions and test solutions

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

4.1.1 Test suspension (N)

A first subculture was obtained from the stock culture of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 by streaking onto TSA plates and incubated for 24 hours at 36 °C ± 1 °C. From this first culture a second culture was obtained in the same way and incubated for 24 hours at 36 °C ± 1 °C. The second culture was the working culture.

The suspension was adjusted using a spectrophotometer to a final concentration of 1.5 x 10^9 cfu/ml to 5.0 x 10^9 cfu/ml. The test suspension was maintained in the water bath at 20°C and used within 2 hours.

For counting 10^{-7} and 10^{-8} dilutions were prepared in diluent, and 1 ml of each dilution was taken in duplicate and inoculated into separate petri dishes where 15 to 20 ml of TSA were added.

4.1.2 Validation suspension (Nv)

To prepare the validation suspension, the test suspension (N) was diluted with diluent in order to obtain a microbial count of 3 x 10^2 cfu/ml to 1.6 x 10^3 cfu/ml.

For estimating the Nv value, a 10-1 dilution was performed and 1 ml was taken in duplicate and inoculated into separate petri dishes where 15 to 20 ml of TSA were added.

4.1.3 Product test solutions.

Solution A: solution A was prepared putting in a 1000 ml volumetric flask 5 g of product F1092 and then filling up with hard water.

Solution B: solution B was prepared putting in a 1000 ml volumetric flask 20 ml of product F1400 and then filling up with hard water.

The solution A was discarded after the test, the solution B was kept for 30 days to perform the second test with the same solution.

4.2 Test Procedure

4.2.1 Experimental conditions.

Temperature: 20°C ± 1°C
Contact time for Solution A: 15 min ± 10 sec
Contact time for Solution B: 15 min ± 10 sec

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

Interfering substance: 0.3 g/l bovine albumin (clean conditions)

4.2.2 Selection of the neutralizer

To find out a suitable neutralizer for each test solution a method validation C was performed before the test. In the case of the solution A the Neutralizer (3.1.7) demonstrated to be effective. For the solution B it wasn't effective, and therefore the removal of the activity of the product was performed by using the membrane filtration procedure.

4.2.3 Equilibration of temperature

Prior to the test, all reagents, test suspensions (N and Nv), diluent, hard water and interfering substance were equilibrate to 20°C ± 1°C in a water bath.

4.2.4 Inoculation of the carriers

In a sterile tube 1 ml of interfering substance was mixed with 9 ml of test suspension (N). Fifty microliters of this mixed were put on the inoculation square of a carrier. Two carriers were prepared at the same time and they were let dry inside an incubator at 37°C ± 1°C for less than one hour.

4.2.5 Test Na (bactericidal activity) and Nw (Water control)

STEP 1: 10 ml of solution A were put into a cylindrical screw tube placed in a water bath at 20°C. One inoculated carrier was immersed inside the solution A for the contact time.
STEP 2: At the end of the contact time the carrier was removed from the solution A and was washed for 2 min ± 10 sec with 50 ml of hard water. The washing water was collected in a sterile 100 ml container.
STEP 3: After the washing the carrier was put inside another cylindrical screw tube placed in a water bath at 20°C containing 10 ml of solution B for the contact time.
STEP 4: At the end of the contact time the carrier was removed from the solution B and it was put in 10 ml of neutralizer.
The same procedure was followed for the Water control in which solutions A and B were substituted by hard water.

For STEP 1, immediately after the carrier was removed from solution A, 1 ml of it was transferred into 9 ml of neutralizer, mixed for 10 seconds and then samples of 1 ml were plated in duplicate. The dilutions were performed in diluent. The same procedure was followed for the water control.
For STEP 2, immediately after washing the carrier portions of 1 ml of water were plated in duplicate. The dilutions were performed in diluent. The same procedure was followed for the water control.
For STEP 3: immediately after the carrier was removed from solution B, 1 ml of it was filtered in duplicate through a membrane 0.45 µm pore size. The dilutions were performed in diluent and filtered as well. The same procedure was followed for the water control.

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

For STEP 4: the neutralizing solution in which the carrier was put was filtered in duplicate through a membrane 0.45 µm pore size. The dilutions were performed in diluent and filtered as well. The same procedure was followed for the water control.

4.2.6 Experimental conditions – Control A

To 1 ml of interfering substance 1 ml of validation suspension (Nv) was added. The mix was put into a water bath at 20°C for 2 minutes. At the end of the time 8 ml of hard water were added to the mix and the tube was put into a water bath at 20°C for 15 minutes (contact time). At the end of the time 1 ml of this mixture was taken in duplicate and plated.

4.2.7 Experimental conditions – Control B

One millilitre of validation suspension (Nv) was added to 8 ml of neutralizer and 1 ml of water, it was mixed and the tube was put into a water bath at 20°C for 5 minutes. At the end of the time 1 ml of this mixture was taken in duplicate and plated.

4.2.8 Experimental conditions – Control C

For test solution A:

In a test tube 1 ml of interfering substance and 1 ml of diluent were put. To this mix there were added 8 ml of solution A, and the tube was put into a water bath at 20°C for 15 minutes (contact time). At the end of the time 1 ml of mixture was transferred into a tube containing 8 ml of neutralizer and it was put into a water bath at 20°C for 5 minutes. At the end of the time, 1 ml of validation suspension (Nv) was added, and the tube was put into a water bath at 20°C for 30 minutes. At the end of the time 1 ml of this mixture was taken in duplicate and plated.

For solution B:

In a filtration device there were put 50 ml of rinsing solution. To this solution 0.1 ml of solution B were added and then filtered. Another 50 ml of rinsing solution were put and then 0.1 ml of Nv were added and filtered. One more filtration of 50 ml of rinsing solution was done, and a final filtration with 50 ml of water. The membrane was put over the surface of a TSA petri dish. The procedure was performed in duplicate.

4.2.9 Test procedure with the a 30 days old B solution

All the test procedure described from 4.2.1 to 4.2.8 was performed a second time using a freshly prepared A solution and a 30 days old B solution.

4.2.10 Incubation and counting

All the petri dishes were plated with TSA, and were incubated for 42 – 48 h at 36°C ± 1°C. For the pour plate method the counting limits are 14 – 330 cfu/plate, for the membrane filtration counting the limits are 14 – 165 cfu/plate.

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

4.3 Acceptance Criteria

N is between 1.5 x 10^9 and 5.0 x 10^9 cfu/ml (9.17 ≤ log N ≤ 9.70)

N_{v0} is between 30 and 160 cfu/ml

A, B, C are equal or greater than 0.5 x N_{v0}

5 RESULTS

5.1 Test performed with the freshly prepared A solution and B solution.

5.1.1 Method Validation and N value

Test Organisms	Test Suspension N	Validation Suspension N_V	Validation Procedure			
			Experimental Conditions Control *A*	Neutralizer Control *B*	Method Validation *C (0.5% F1092)*	Method Validation *C (2% F 1400)*
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	**10^{-7} :** >330 - >330 **10^{-8} :** 48 - 50 N = 4.9 × 10^9 log N = 9.69	**10^{-1} :** 158 - 156 N_V = 1.6 × 10^3 N_{V0} = 157	V_c : 128 - 117 A = 122.5 **PASS**	V_c : 118 - 112 B = 115 **PASS**	V_c : 148 - 139 C = 143.5 **PASS**	V_c : 120 - 121 C = 120.5 **PASS**

5.1.2 Test Results

Test Organism	Test	Test Procedure			
		STEP 1	STEP 2	STEP 3	STEP 4
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	Nw (Water control)	**10^{-3} :** > 330 - >330 **10^{-4} :** 201 - 212 **10^{-5} :** 21 - 22 Nw_1 = 2.1 × 10^6 log Nw_1 = 6.32	**10^{-1} :** >330 - >330 **10^{-2} :** >330 - >330 **10^{-3} :** 77 - 65 Nw_2 = 7.1 × 10^4 log Nw_2 = 4.85	**10^{-1} :** >330 - >330 **10^{-2} :** 38 - 40 **10^{-3} :** 2 - 1 Nw_3 = 3.9 × 10^3 log Nw_3 = 3.59	**10^{-2} :** >330 - >330 **10^{-3} :** 94 - 98 **10^{-4} :** 16 - 7 Nw_4 = 9.8 × 10^4 log Nw_4 = 4.97
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	Na (Bactericidal activity)	**10^{-1} :** 0 - 0 **10^{-2} :** 0 - 0 Na_1 < 1.4 × 10^2 log Na_1 < 2.15 log R > 4.17	**10^{0} :** 0 - 0 **10^{-1} :** 0 - 0 **10^{-2} :** 0 - 0 Na_2 < 1.4 × 10^1 log Na_2 < 1.15 log R > 3.7	**10^{0} :** 0 - 0 **10^{-1} :** 0 - 0 Na_3 < 1.4 × 10^1 log Na_3 < 1.15 log R > 2.44	**10^{0} :** 0 - 0 **10^{-1} :** 0 - 0 Na_4 < 1.4 × 10^1 log Na_4 < 1.15 log R > 3.82

5.2 Test performed with the freshly prepared A solution and 30 days old B solution.

5.2.1 Method validation and N value

Report digitally signed in accordance with Legislative Decree No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

Test Organisms	Test Suspension N	Validation Suspension N_V	Validation Procedure			
			Experimental Conditions Control *A*	Neutralizer Control *B*	Method Validation *C (0.5% F1092)*	Method Validation *C (2% F 1400)*
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	10^{-7} : >330 - >330 10^{-8} : 47 - 49 N = 4.8×10^{9} log N = 9.68	10^{-1} : 151 - 155 N_V = 1.5×10^{3} N_{V0} = 153	V_c : 135 - 129 A = 132 **PASS**	V_c : 127 - 122 B = 124.5 **PASS**	V_c : 142 - 134 C = 138 **PASS**	V_c : 128 - 135 C = 131.5 **PASS**

5.2.2 Test Results

Test Organism	Test	Test Procedure			
		STEP 1	STEP 2	STEP 3	STEP 4
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	Nw (Water control)	10^{-3} : > 330 - >330 10^{-4} : >330 - >330 10^{-5} : 96 - 65 Nw_1 = 8.1×10^{6} log Nw_1 = 6.90	10^{-1} : >330 - >330 10^{-2} : >330 - >330 10^{-3} : 157 - 155 Nw_2 = 1.6×10^{5} log Nw_2 = 5.19	10^{-1} : >330 - >330 10^{-2} : 107 - 114 10^{-3} : 13 - 7 Nw_3 = 1.1×10^{4} log Nw_3 = 4.04	10^{-2} : >330 - >330 10^{-3} : >330 - >330 10^{-4} : 50 - 30 Nw_4 = 4.0×10^{5} log Nw_4 = 5.65
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	Na (Bactericidal activity)	10^{-1} : 0 - 0 10^{-2} : 0 - 0 Na_1 < 1.4×10^{2} log Na_1 < 2.15 log R > 4.75	10^{0} : 0 - 0 10^{-1} : 0 - 0 10^{-2} : 0 - 0 Na_2 < 1.4×10^{1} log Na_2 < 1.15 log R > 4.04	10^{0} : 0 - 0 10^{-1} : 0 - 0 Na_3 < 1.4×10^{1} log Na_3 < 1.15 log R > 2.89	10^{0} : 0 - 0 10^{-1} : 0 - 0 Na_4 < 1.4×10^{1} log Na_4 < 1.15 log R > 4.5

5.3 Calculation of Nw and R values.

To obtain the Nw value in this modified procedure we have had to make the summation of the 4 Nw values we have obtained, reporting them to the final volume in which the inoculum was contained.
To calculate the R value we have to consider the final volume in which the frosted glass carried was immersed, that is 10 ml. So the results obtained in STEP 4 have been multiplied by 10.
The results of the calculations are in the following table:

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

Calculation of Nw and R values			
Solutions A and B freshly prepared		Volume	
	Nw_1 = 2.1×10^6	10	2.1×10^7
	Nw_2 = 7.1×10^4	50	3.6×10^6
	Nw_3 = 3.9×10^3	10	3.9×10^4
	Nw_4 = 9.9×10^4	10	9.9×10^5
	Nw		2.6×10^7
	log *Nw*		**7.40**
	log Na		**< 2.15**
	R		**> 5.25**
Solution A freshly prepared, solution B 30 days old		Volume	
	Nw_1 = 8.1×10^6	10	8.1×10^7
	Nw_2 = 1.6×10^5	50	8.0×10^6
	Nw_3 = 1.1×10^4	10	1.1×10^5
	Nw_4 = 4.0×10^5	10	4.0×10^6
	Nw		9.3×10^7
	log *Nw*		**7.96**
	log *Na*		**< 2.15**
			> 5.81

6 CONCLUSIONS

The EN 14561:2006 requires for bactericidal activity a log reduction >5 log. This bactericidal activity is calculated as log Nw – log Na.

The first test (5.1), showed an R value **> 5.25,** while the second test showed an R value **>5.81,** thus the procedure of immersing the carrier in the solution A (F1092 0.5%), for 15 minutes under clean conditions at 20°C, and then rinsing with 50 ml of water, and then immersing the same carrier for another 15 minutes in solution B (F1400 2%) under clean conditions at 20 degrees, demonstrate to reduce the concentration of Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442 in more than 5 log.

Furthermore, the R value calculated in each step of the process demonstrate that the test solutions and the rinsing water doesn't get contaminated with the microbial strain after one use.

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

TITLE: Evaluation of the fungicidal activity of a couple of disinfectants using a method based on EN 14562:2006

Sample ID:	*20.507780.0002*
Description:	*Product for solution A:F1092 (lot: (10)9S12N1285 - Exp 02/2022* *Product for Solution B: F1400 (lot(10) 9S17N2181 Exp 03/2022*
Ref. AR:	*2013/289/E/Chapter 15*
Starting date:	*30/03/2020*
Report emission date:	*25/05/2020*
Prepared by:	*Lelia Vecchio*

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

SUMMARY

1 Abstract of results 3
2 Aim of the Method 3
3 Materials and Equipment 3
3.1 Material 3
3.2 Instruments 4
4 Procedure 5
4.1 Preparation of test organism suspensions and test solutions 5
4.2 Test Procedure 6
4.3 Acceptance Criteria 8
5 Results 9
5.1 Test performed with the freshly prepared A solution and B solution. 9
5.2 Test performed with the freshly prepared A solution and 30 days old B solution. 9
5.3 Calculation of Nw and R values. 10
6 Conclusions 11

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

1 ABSTRACT OF RESULTS

The modified EN 14562 method demonstrate that the couple of disinfectants F1092 and F1400, used together, with a rinsing step between them, have fungicidal activity against Aspergillus brasiliensis ATCC 16404 when used in the conditions described in the test.

2 AIM OF THE METHOD

The aim of this test method is to test the efficacy of 2 chemical disinfectants applied over the surface of a frosted glass carrier one after the other, with a rinsing step in the middle.

3 MATERIALS AND EQUIPMENT

3.1 Material

3.1.1 Water

Free from substances that are toxic or inhibiting to the bacteria. It is freshly distilled water, not demineralized, sterilized at 121 °C for 15 minutes.

3.1.2 Hard Water for Dilution of Product (HW)

In a volumetric flask were placed 600 ml of sterile water and added:

Solution A	6 ml
Solution B	8 ml
Water	up to 1000 ml

pH 7.0 ± 0.2

The solution has been used within 12 hours.

3.1.3 Solution A

$MgCl_2$	19.84 g
$CaCl_2$	46.24 g
Water	up to 1000 ml

Sterilized by passing through a filter with a maximum effective pore size of 0.45 µm, stored at 2-8 °C for a maximum holding time of one month.

3.1.4 Solution B

$NaHCO_3$	35.02 g
Water	up to 1000 ml

Sterilized by passing through a filter with a maximum effective pore size of 0.45 µm, stored at 2-8 °C for a maximum holding time of 7 days.

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

3.1.5 Diluent (Maximum Recovery Diluent, MRD)

Tryptone sodium chloride solution consisting of:

Tryptone, pancreatic digest of casein	1 g
Sodium chloride	8,5 g

pH 7,0 ± 0.2. Sterilize at 121 °C for 15 minutes, store at room temperature for a maximum holding time of three months.

3.1.6 Malt Extract Agar (MEA)

Malt extract	30,0 g
Mycobiological peptone	5.0 g
Agar	15,0 g

pH 5.4 ± 0.2. Sterilize at 115°C for 10 minutes, store at room temperature for a maximum holding time of three months.

3.1.7 Neutralizer

Lecithin	3 g/l
Tween 80	30 g/l
Sodium thiosulfate	5 g/l
L-Histidine	1 g/l
Saponine	30 g/l

In phosphate buffer 1%. Sterilize at 121°C for 15 minutes, store at room temperature for a maximum holding time of three months.

3.1.8 Interfering substance (clean conditions)

Bovine albumin	0.3 g
Water	100 ml

Sterilize by passing through a filter with a maximum effective pore size of 0.45 μm, store at 2-8 °C for a maximum holding time of one month. The final concentration of bovine albumin in the test procedure is 3 g/l.

3.1.9 Microbial strain

Aspergillus brasiliensis ATCC 16404

3.2 Instruments

3.2.1 Stopwatch

3.2.2 Graduated pipettes of nominal capacities 10 ml, 5 ml, 2 ml, 1 ml

3.2.3 Water bath 45 °C ± 1 °C

3.2.4 Water bath 20 °C ± 1 °C

3.2.5 Incubator 30 °C ± 1 °C

3.2.6 Refrigerator 5 °C ± 3 °C

3.2.7 Analytical balance

3.2.8 pH-meter

3.2.9 Vortex® mixer

3.2.10 Spectrophotometer

3.2.11 Container: test tubes or flasks of suitable capacity

3.2.12 Glass beads (diameter 3 mm to 4 mm)

3.2.13 Class II safety cabinet

3.2.14 Volumetric flasks

3.2.15 Optical microscope

3.2.16 Frosted glass carriers, 15 mm x 60 mm x 1 mm. One surface sandblasted.

3.2.17 Petri dishes (diameter 90 mm)

3.2.18 Usual microbiological laboratory equipment

All glassware and parts of the apparatus that came in contact with the culture media and reagents or the sample (except those which are supplied sterile) shall be sterilized at 121°C for 15 minutes.

4 PROCEDURE

4.1 Preparation of test organism suspensions and test solutions

4.1.1 Test suspension (N)

The working cultures of *Aspergillus brasiliensis* were taken and, using a sterile spatula, the conidiospores were detached from the culture surface and then suspended in 20 ml of sterile 0.05% (w/v) polysorbate 80 solution in water. The suspension was filtered through a fritted filter.

Immediately after the preparation a microscopic examination was carried out under × 400 magnification to verify:

- the presence of a high concentration of characteristic mature spores (i.e. at least 75% spiny spores)

- the absence of mycelia fragments

- the absence of spore germination.

The number of cells in the suspension was adjusted to $1.5 \times 10^8 – 5.0 \times 10^8$ cfu/ml using diluent. These suspension was maintained in water bath at 20 °C ± 1° C and used within 4 hours.

For counting 10^{-6} and 10^{-7} dilutions were prepared in diluent, and 1 ml of each dilution was taken in duplicate and inoculated into separate petri dishes where 15 to 20 ml of MEA were added.

4.1.2 Validation suspension (Nv)

To prepare the validation suspension, the test suspension (N) was diluted with diluent in order to obtain a microbial count of 3×10^2 cfu/ml to 1.6×10^3 cfu/ml.

For estimating the Nv value, a 10-1 dilution was performed and 1 ml was taken in duplicate and inoculated into separate petri dishes where 15 to 20 ml of MEA were added.

4.1.3 Product test solutions.

Solution A: solution A was prepared putting in a 1000 ml volumetric flask 5 g of product F1092 and then filling up with hard water.

Solution B: solution B was prepared putting in a 1000 ml volumetric flask 20 ml of product F1400 and then filling up with hard water.

The solution A was discarded after the test, the solution B was kept for 30 days to perform the second test with the same solution.

4.2 Test Procedure

4.2.1 Experimental conditions.

Temperature: 20°C ± 1°C
Contact time for Solution A: 15 min ± 10 sec
Contact time for Solution B: 15 min ± 10 sec

Interfering substance: 0.3 g/l bovine albumin (clean conditions)

4.2.2 Selection of the neutralizer

To find out a suitable neutralizer for each test solution a method validation C was performed before the test. For both solutions the neutralizer (3.1.7) demonstrated to be suitable.

4.2.3 Equilibration of temperature

Prior to the test, all reagents, test suspensions (N and Nv), diluent, hard water and interfering substance were equilibrate to 20°C ± 1°C in a water bath.

4.2.4 Inoculation of the carriers

In a sterile tube 1 ml of interfering substance was mixed with 9 ml of test suspension (N). Fifty microliters of this mixed were put on the inoculation square of a carrier. Two carriers were prepared at the same time and they were let dry inside an incubator at 37°C ± 1°C for less than one hour.

4.2.5 Test Na (bactericidal activity) and Nw (Water control)

STEP 1: 10 ml of solution A were put into a cylindrical screw tube placed in a water bath at 20°C. One inoculated carrier was immersed inside the solution A for the contact time.
STEP 2: At the end of the contact time the carrier was removed from the solution A and was washed for 2 min ± 10 sec with 50 ml of hard water. The washing water was collected in a sterile 100 ml container.
STEP 3: After the washing the carrier was put inside another cylindrical screw tube placed in a water bath at 20°C containing 10 ml of solution B for the contact time.
STEP 4: At the end of the contact time the carrier was removed from the solution B and it was put in a tube containing 10 ml of neutralizer.
The same procedure was followed for the Water control in which solutions A and B were substituted by hard water.

For STEP 1, immediately after the carrier was removed from solution A, 1 ml of it was transferred into 9 ml of neutralizer, mixed for 10 seconds and then samples of 1 ml were plated in duplicate. The dilutions were performed in diluent. The same procedure was followed for the water control.
For STEP 2, immediately after washing the carrier portions of 1 ml of water were plated in duplicate. The dilutions were performed in diluent. The same procedure was followed for the water control.
For STEP 3: immediately after the carrier was removed from solution B, was transferred into 9 ml of neutralizer, mixed for 10 seconds and then samples of 1 ml were plated in duplicate. The dilutions were performed in diluent. The same procedure was followed for the water control.

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

For STEP 4: the carrier in the neutralizing solution was accurately mix, with the aid of small glass beads, and then samples of 1 ml were plated in duplicate. The dilutions were performed in diluent and filtered as well. The same procedure was followed for the water control.

4.2.6 Experimental conditions – Control A

To 1 ml of interfering substance 1 ml of validation suspension (Nv) was added. The mix was put into a water bath at 20°C for 2 minutes. At the end of the time 8 ml of hard water were added to the mix and the tube was put into a water bath at 20°C for 15 minutes (contact time). At the end of the time 1 ml of this mixture was taken in duplicate and plated.

4.2.7 Experimental conditions – Control B

One millilitre of validation suspension (Nv) was added to 8 ml of neutralizer and 1 ml of water, it was mixed and the tube was put into a water bath at 20°C for 5 minutes. At the end of the time 1 ml of this mixture was taken in duplicate and plated.

4.2.8 Experimental conditions – Control C

For test solution A:

In a test tube 1 ml of interfering substance and 1 ml of diluent were put. To this mix there were added 8 ml of solution A, and the tube was put into a water bath at 20°C for 15 minutes (contact time). At the end of the time 1 ml of mixture was transferred into a tube containing 8 ml of neutralizer and it was put into a water bath at 20°C for 5 minutes. At the end of the time, 1 ml of validation suspension (Nv) was added, and the tube was put into a water bath at 20°C for 30 minutes. At the end of the time 1 ml of this mixture was taken in duplicate and plated.
The same procedure was repeated for solution B.

4.2.9 Test procedure with the a 30 days old B solution

All the test procedure described from 4.2.1 to 4.2.8 was performed a second time using a freshly prepared A solution and a 30 days old B solution.

4.2.10 Incubation and counting

All the petri dishes were plated with MEA, and were incubated for 48 – 72 h at 30°C ± 1°C. The counting limits are 14 – 165 cfu/plate.

4.3 Acceptance Criteria

N is between 1.5×10^8 and 5.0×10^8 cfu/ml ($8.17 \leq \log N \leq 8.70$)

N_{v0} is between 30 and 160 cfu/ml

A, B, C are equal or greater than $0.5 \times N_{v0}$

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

5 RESULTS

5.1 Test performed with the freshly prepared A solution and B solution.

5.1.1 Method Validation and N value

Test Organisms	Test Suspension N	Validation Suspension N_V	Validation Procedure			
			Experimental Conditions Control *A*	Neutralizer Control *B*	Method Validation *C (0.5% F1092)*	Method Validation *C (2% F 1400)*
Aspergillus brasiliensis ATCC 16404	**10^{-6} :** 145 - 156 **10^{-7} :** 12 - 13 $N = 1.5 \times 10^8$ $\log N = 8.16$	**10^{-1} :** 34 - 30 $N_V = 3.2 \times 10^2$ $N_{V0} = 32$	V_c **:** 42 - 35 **A** = 38.5 **PASS**	V_c **:** 39 - 44 **B** = 41.5 **PASS**	V_c **:** 22 - 32 **C** = 27 **PASS**	V_c **:** 41 - 36 **C** = 38.5 **PASS**

5.1.2 Test Results

Test Organism	Test	Test Procedure			
		STEP 1	STEP 2	STEP 3	STEP 4
Aspergillus brasiliensis ATCC 16404	Nw (Water control)	**10^{-2} :** >165 - >165 **10^{-3} :** >165 - >165 **10^{-4} :** 24 - 39 **10^{-5} :** 5 - 3 $Nw_1 = 3.2 \times 10^5$ $\log Nw_1 = 5.50$	**10^{-1} :** >165 - >165 **10^{-2} :** >165 - >165 **10^{-3} :** 49 - 40 $Nw_2 = 4.5 \times 10^4$ $\log Nw_2 = 4.65$	**10^{-1} :** 18 - 22 **10^{-2} :** 5 - 4 **10^{-3} :** 0 - 0 **10^{-4} :** 0 - 0 $Nw_3 = 2.0 \times 10^2$ $\log Nw_3 = 2.30$	**10^{-2} :** >165 - >165 **10^{-3} :** 22 - 22 **10^{-4} :** 1 - 1 **10^{-5} :** 1 - 0 $Nw_4 = 2.2 \times 10^4$ $\log Nw_4 = 4.34$
Aspergillus brasiliensis ATCC 16404	Na (fungicidal activity)	**10^{-1} :** >165 - >165 **10^{-2} :** 88 - 72 **10^{-3} :** 9 - 12 **10^{-4} :** 3 - 2 $Na_1 = 8.0 \times 10^3$ $\log Na_1 = 3.90$ $\log R = 1.60$	**10^{0} :** >165 - >165 **10^{-1} :** >165 - >165 **10^{-2} :** 140 - 128 $Na_2 = 1.3 \times 10^4$ $\log Na_2 = 4.13$ $\log R = 0.52$	**10^{0} :** 0 - 0 **10^{-1} :** 0 - 0 **10^{-2} :** 0 - 0 $Na_3 < 1.4 \times 10^1$ $\log Na_3 < 1.15$ $\log R > 1.15$	**10^{0} :** 1 - 2 **10^{-1} :** 0 - 0 **10^{-2} :** 0 - 0 **10^{-3} :** 0 - 0 $Na_4 < 1.4 \times 10^1$ $\log Na_4 < 1.15$ $\log R > 3.19$

5.2 Test performed with the freshly prepared A solution and 30 days old B solution.

5.2.1 Method validation and N value

Test Organisms	Test Suspension N	Validation Suspension N_V	Validation Procedure			
			Experimental Conditions Control *A*	Neutralizer Control *B*	Method Validation *C (0.5% F1092)*	Method Validation *C (2% F 1400)*
Aspergillus brasiliensis ATCC 16404	**10^{-6} :** 148 - 153 **10^{-7} :** 12 - 15 $N = 1.5 \times 10^8$ $\log N = 8.18$	**10^{-1} :** 41 - 29 $N_V = 3.5 \times 10^2$ $N_{V0} = 35$	V_c **:** 24 - 32 **A** = 28 **PASS**	V_c **:** 25 - 34 **B** = 29.5 **PASS**	V_c **:** 28 - 28 **C** = 28 **PASS**	V_c **:** 28 - 26 **C** = 27 **PASS**

5.2.2 Test Results

Test Organism	Test	Test Procedure			
		STEP 1	STEP 2	STEP 3	STEP 4
Aspergillus brasiliensis ATCC 16404	Nw (Water control)	10^{-2} : >165 - >165 10^{-3} : >165 - >165 10^{-4} : 43 - 42 10^{-5} : 5 - 7 $Nw_1 = 4.3 \times 10^5$ $\log Nw_1 = 5.63$	10^{-1} : >165 - >165 10^{-2} : >165 - >165 10^{-3} : 37 - 55 $Nw_2 = 4.6 \times 10^4$ $\log Nw_2 = 4.66$	10^{-1} : >165 - >165 10^{-2} : 31 - 32 10^{-3} : 2 - 4 10^{-4} : 1 - 0 $Nw_3 = 3.2 \times 10^3$ $\log Nw_3 = 3.50$	10^{-2} : >165 - >165 10^{-3} : 21 - 23 10^{-4} : 2 - 4 10^{-5} : 1 - 0 $Nw_4 = 2.2 \times 10^4$ $\log Nw_4 = 4.34$
Aspergillus brasiliensis ATCC 16404	Na (fungicidal activity)	10^{-1} : >165 - >165 10^{-2} : >165 - >165 10^{-3} : >165 - >165 10^{-4} : 27 - 17 $Na_1 = 2.2 \times 10^5$ $\log Na_1 = 5.34$ $\log R = 0.29$	10^{0} : >165 - >165 10^{-1} : >165 - >165 10^{-2} : 57 - 51 $Na_2 = 5.4 \times 10^3$ $\log Na_2 = 3.72$ $\log R = 0.94$	10^{0} : 0 - 0 10^{-1} : 0 - 0 10^{-2} : 0 - 0 $Na_3 < 1.4 \times 10^1$ $\log Na_3 < 1.15$ $\log R > 1.15$	10^{0} : 44 - 43 10^{-1} : 9 - 3 10^{-2} : 0 - 0 10^{-3} : 0 - 0 $Na_4 = 4.3 \times 10^1$ $\log Na_4 = 1.64$ $\log R = 2.7$

5.3 Calculation of Nw and R values.

To obtain the Nw value in this modified procedure we have had to make the summation of the 4 Nw values we have obtained, reporting them to the final volume in which the inoculum was contained.

To calculate the R value we have to consider the final volume in which the frosted glass carried was immersed, that is 10 ml. So the results obtained in STEP 4 have been multiplied by 10.

The results of the calculations are in the following table:

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

Calculation of Nw and R values			
Solutions A and B freshly prepared		Volume	
	Nw_1 = 3.2 × 10^5	10	3.2 × 10^6
	Nw_2 = 4.5 × 10^4	50	2.3 × 10^6
	Nw_3 = 2.0 × 10^2	10	2.0 × 10^3
	Nw_4 = 2.2 × 10^4	10	2.2 × 10^5
	Nw		5.7 × 10^6
	log *Nw*		**6.76**
	log Na		**< 2.15**
	R		**> 4.61**
Solution A freshly prepared, solution B 30 days old		Volume	
	Nw_1 = 4.3 × 10^5	10	4.3 × 10^6
	Nw_2 = 4.6 × 10^4	50	2.3 × 10^6
	Nw_3 = 3.2 × 10^3	10	3.2 × 10^4
	Nw_4 = 2.2 × 10^4	10	2.2 × 10^5
	Nw		6.9 × 10^6
	log *Nw*		**6.83**
	log *Na*		**2.64**
			4.19

6 CONCLUSIONS

The EN 14562:2006 requires for fungicidal activity a log reduction >4 log. This fungicidal activity is calculated as log Nw – log Na.

The first test (5.1), showed an R value **> 4.61,** while the second test showed an R value equal to **4.19,** thus the procedure of immersing the carrier in the solution A (F1092 0.5%), for 15 minutes under clean conditions at 20°C, and then rinsing with 50 ml of water, and then immersing the same carrier for another 15 minutes in solution B (F1400 2%) under clean conditions at 20 degrees, demonstrate to reduce the concentration of *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 in more than 4 log.
The R value obtained in solution B demonstrated that the solution doesn't get contaminated by the strain after one use.

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

Institut de
Recherche
Microbiologique

RAPPORT D'ESSAI

N° 600/1004/M-1

DELIVRE A : **ALKAPHARM**
30 avenue Amiral Lemonnier
78160 MARLY LE ROY

PRODUIT : **ALKACIDE**

DEMANDE D'ESSAI DU : 8 octobre 2004

ANALYSE REFERENCE : 600/1004

ESSAI : NORME EUROPEENNE NF EN 13727 (juillet 2004) : antiseptiques et désinfectants chimiques - essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide des désinfectants chimiques pour les instruments utilisés en médecine - méthode d'essai et exigences (phase 2, étape 1).

Méthode par dilution-neutralisation.

Ce rapport comporte 5 pages.

Il ne concerne que le produit soumis à l'essai.

Date d'émission : 17 novembre 2004
Date de réédition : 03 août 2005

Raphaël DUGUÉ
Maître ès Sciences
Responsable des essais

Corinne BENOLIEL
Docteur en Pharmacie
Directrice Scientifique

I - IDENTIFICATION COMPLETE DE L'ECHANTILLON

Nom du produit : **ALKACIDE**

* numéro du lot : 2003.05.01.67

* fabricant : **ALKAPHARM**
30 avenue Amiral Lemonnier
78160 MARLY LE ROY

Date de réception à l'I.R.M. : 8 octobre 2004

Conditions de stockage : sur la paillasse du laboratoire, à température ambiante.

Période d'analyse : octobre – novembre 2004

Substance(s) active(s) et concentration(s) : non précisé.

Aspect du produit et de ses dilutions : Solution limpide bleue

II - CONDITIONS EXPERIMENTALES

Temps de contact : 15 min ± 10 s

Température d'essai : 20°C ± 1°C

Diluant du produit utilisé lors des essais : eau dure à 375 mg/kg de $CaCO_3$.

Diluant du produit recommandé par le fabricant : eau du réseau.

Souches bactériennes :

Pseudomonas aeruginosa	CIP 103 467	incubation 48h à 37°C ± 1°C
Staphylococcus aureus	CIP 4.83	incubation 48h à 37°C ± 1°C
Enterococcus hirae	CIP 58.55	incubation 48h à 37°C ± 1°C

Substance interférente : conditions de propreté.

* Composition : albumine bovine à 0,3 g/l en final lors de l'essai.

Stabilité du mélange produit - substance interférente : absence de précipité au cours de l'essai.

Méthode de dénombrement : dénombrement par inclusion en milieu gélosé.

III - MODE OPERATOIRE POUR LES ESSAIS PRELIMINAIRES

Neutralisant :

* Composition : solution en eau distillée stérile de 10 % (v/v) de tween 80, 6 % (m/v) de saponine, 2 % (m/v) de lécithine, 0,2 % (m/v) de L-cystéine et 0,2 % (m/v) de L-histidine.

* Mode de préparation : dissolution à chaud des différents ingrédients et stérilisation par autoclavage 121°C/15 minutes.

Neutralisant(s) ajouté(s) au milieu de dénombrement et concentration(s) : néant.

Autres additions au milieu de dénombrement : néant.

Milieux de dénombrement particuliers : néant.

IV - VALIDATION DE LA METHODE DE NEUTRALISATION

Souche de microorganismes	Concentration en produit testée	Suspension bactérienne d'essai	Essai de validation			
			Suspension bactérienne	Conditions expérimentales	Non toxicité du neutralisant	Inactivation par dilution-neutralisation
Pseudomonas aeruginosa CIP 103 467	0,5 %(v/v)	10^{-6} : >330 ; >330 10^{-7} : 33 ; 37 (N = 3,5 x 10^{8})	55 ; 57 (Nv = 560) (Nvo = 56)	51 ; 61 (A = 56)	51 ; 53 (B = 52)	50 ; 58 (C = 54)
Staphylococcus aureus CIP 4.83	0,1 %(v/v)	10^{-6} : >330 ; >330 10^{-7} : 39 ; 41 (N = 4,0 x 10^{8})	67 ; 75 (Nv = 710) (Nvo =71)	71 ; 69 (A = 70)	70 ; 72 (B = 71)	58 ; 66 (C = 62)
Enterococcus hirae CIP 5855	0,1 %(v/v)	10^{-6} : 151 ; 155 10^{-7} : 15 ; 16 (N = 1,5 x 10^{8})	56 ; 56 (Nv = 560) (Nvo =56)	42 ; 52 (A = 47)	46 ; 52 (B = 49)	43 ; 45 (C = 44)

N = nombre d'U.F.C. / ml de la suspension bactérienne d'essai
Nv = nombre d'U.F.C. / ml de la suspension bactérienne
Nvo = Nv / 10
A = nombre d'U.F.C. / ml dans l'essai de validation des conditions expérimentales
B = nombre d'U.F.C. / ml dans l'essai de validation de la non-toxicité du neutralisant
C = nombre d'U.F.C. / ml dans l'essai de validation de l'inactivation par dilution - neutralisation

La méthode de neutralisation est validée si :

- N est compris entre 1,5x10^{8} U.F.C./ml et 5x10^{8} U.F.C./ml ;
- Nvo est compris entre 30 U.F.C./ml et 160 U.F.C./ml ;
- A, B et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x Nvo.

La méthode de neutralisation est validée dans les conditions décrites pour une concentration en produit **ALKACIDE** de :

- 0,5 % (v/v) sur la souche *Pseudomonas aeruginosa*
- 0,1 % (v/v) sur les souches *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus hirae.*

V - RESULTATS DES ESSAIS

Souche de microorganismes	Suspension bactérienne d'essai		résultats à la concentration m% (v/v)		
			m = 0,1%	**m = 0,25%**	**m = 0,5%**
Pseudomonas aeruginosa CIP 103 467	10^{-6} : >330 ; >330 10^{-7} : 33 ; 37 (N = 3,5 x 10^8)	Vc Na R	>330 ; >330 >3300 <1,1 x 10^4	0 ; 0 <140 >2,5 x 10^5	0 ; 0 <140 >2,5 x 10^5
			m = 0,05%	**m = 0,075%**	**m = 0,1%**
Staphylococcus aureus CIP 4.83	10^{-6} : >330 ; >330 10^{-7} : 39 ; 41 (N = 4,0 x 10^8)	Vc Na R	>330 ; >330 >3300 <1,2 x 10^4	0 ; 0 <140 >2,9 x 10^5	0 ; 0 <140 >2,9 x 10^5
Enterococcus hirae CIP 5855	10^{-6} : 151 ; 155 10^{-7} : 15 ; 16 (N = 1,5 x 10^8)	Vc Na R	70 ; 68 690 2,2 x 10^4	0 ; 0 <140 >1,1 x 10^5	0 ; 0 <140 >1,1 x 10^5

N = nombre d'U.F.C./ml de la suspension bactérienne d'essai
No = N / 10
Vc = nombre de colonies comptées sur les boîtes
Na = nombre d'U.F.C./ml dans le mélange d'essai
R = réduction du nombre de cellules viables

VI - CONCLUSION

Le produit **ALKACIDE** est bactéricide selon la norme européenne NF EN 13727 (juillet 2004), en 15 minutes de contact à 20°C en présence d'albumine bovine à 0,3 g/l en final lors de l'essai (conditions de propreté) sur les souches de référence *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103 467, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 et *Enterococcus hirae* CIP 5855 à la concentration de 0,25 % (v/v).

RAPPORT D'ESSAI
130-1REA10

Essai selon la méthodologie de la norme NF EN 14561 (Mars 2007)
Adaptation à un support en acier inoxydable
Essai quantitatif de porte germe pour l'évaluation de l'activité bactéricide des désinfectants chimiques pour instruments utilisés en médecine humaine
Méthodes d'essai et exigences (Phase 2, Etape 2)

I. Identification de l'échantillon

Nom du produit :	**Alkacide**
Numéro de lot :	2007.10.01.63
Fabricant :	ALKAPHARM Parc Biocitech - 102 avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE
Date de réception :	14/10/2008
Conditions de stockage :	A température ambiante
Diluant du produit recommandé par le fabricant :	Non précisé
Substance(s) active(s) :	Non précisée
Aspect du produit :	Liquide limpide bleu

Parc BIOCITECH : 102, route de Noisy - 93230 Romainville - FRANCE
tél. : 33 (1) 41 50 59 89 - fax : 33 (1) 41 50 05 06 - www.scientis.fr

II. Principe de l'essai

L'essai selon la méthodologie de la norme NF EN 14561 (2007) adaptée à l'inox a pour but de mettre en évidence une réduction du nombre de microorganismes, lorsque ceux-ci sont mis au contact du produit à l'essai, dans les conditions spécifiées ci-dessous.

Une suspension bactérienne est mélangée à une substance interférente et étalée sur un porte microorganisme de 2cm de diamètre en acier inoxydable (304L). Le support, une fois séché, est plongé dans le produit à tester pendant le temps de contact défini.
Cet essai permet de déterminer une activité bactéricide, dans le domaine d'application, si le taux de réduction est de 10^5 ou plus.

III. Résultats d'essai

NF EN 14561 (2007) **Alkacide** Lot : 2007.10.01.63

Période d'essai : 30/09/2010 au 08/10/2010

Diluant du produit : Eau dure

Méthode par dilution –neutralisation

Neutralisant : Lécithine (3g/l) ; Polysorbate 80 (30g/l) ; Thiosulfate de sodium (5g/l); L-histidine (1g/l); Saponine (30g/l); Tryptone chlorure de sodium (qsp 1l)

Dénombrement en profondeur

Gélose de dénombrement : T.S.A.

Souches testées : *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467
Enterococcus hirae CIP 58.55
Staphylococcus aureus CIP 4.83

Température d'essai : 20°C

Température d'incubation : 37°C

Porte microorganimes : Disques d'acier inoxydable (304L) de 2cm de diamètre

Substances interférentes: **Conditions de propreté** (albumine bovine 0,3g/l)

Temps de contact additionnel : **15 minutes**

Aspect des dilutions du produit : Incolores à bleues

Stabilité des mélanges : Mélanges stables

a. Validation et témoins

Souche (Collection et numéro)	Suspension de validation (N_{v0})	Témoin de conditions expérimentales (A)	Témoin de neutralisant (B)	Validation de la méthode (C)
Pseudomonas aeruginosa CIP 103467	119,5	126,5	120,5	63
Enterococcus hirae CIP 58.55	85,5	89	79	81
Staphylococcus aureus CIP 4.83	71,5	62,5	65	55,5

Critères de validation :
N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml
A, B et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x N_{v0}

La méthode par dilution-neutralisation est validée dans les conditions de l'essai.

b. Suspension d'essai, témoin eau

Souche (Collection et numéro)	*Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467	*Enterococcus hirae* CIP 58.55	*Staphylococcus aureus* CIP 4.83
Suspension d'essai (N)	$4,9 \times 10^9$	$3,9 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$
Lg N	9,7	9,6	9,4

Critères de validation :
N est compris entre $1,5 \times 10^9$ UFC/ml et 5×10^9 UFC/ml
$9,17 \leq \lg N \leq 9,7$

Souche (Collection et numéro)	*Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467	*Enterococcus hirae* CIP 58.55	*Staphylococcus aureus* CIP 4.83
Témoin eau (Nw)	$3,8 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
Lg Nw	7,6	8,0	8,1

Critères de validation :
$7,15 \leq \lg Nw \leq \lg N - 1,3$

c. Essai

		Nombre de cellules viables dans l'essai (Na) et taux de réduction (R) aux concentrations de produit testées		
Souche (Collection et numéro)		0,05%(v/v)	0,1%(v/v)	1% (v/v)
Pseudomonas aeruginosa CIP 103467	Na	>3,3 x 10^6	>3,3 x 10^6	<140
	lg Na	>6,5	>6,5	<2,2
	lg R	**<1,1**	**<1,1**	**>5,4**
Enterococcus hirae CIP 58.55	Na	>3,3 x 10^6	>3,3 x 10^6	<140
	lg Na	>6,5	>6,5	<2,2
	lg R	**<1,5**	**<1,5**	**>5,8**
Staphylococcus aureus CIP 4.83	Na	>3,3 x 10^6	>3,3 x 10^6	<140
	lg Na	>6,5	>6,5	<2,2
	lg R	**<1,6**	**<1,6**	**>5,9**

Calcul du taux de réduction (R)
lg R = lg N_w - lg Na
Une concentration est bactericide si lgR ≥ 5

IV. Conclusion

Le produit **Alkacide, lot 2007.10.01.63,** est conforme à la méthodologie de la norme EN 14561 adaptée sur support inox. Il présente une activité bactéricide à la concentration de 1%, en présence de conditions de propreté, à 20°C et en 15 minutes de contact.

Romainville, le 11 octobre 2010

Corinne BENOLIEL
Docteur en pharmacie
Directrice scientifique

RAPPORT D'ESSAI
017-1REA11

Essai selon la méthodologie de la norme NF EN 14561 (Mars 2007)
Adaptation à un support en acier inoxydable
Essai quantitatif de porte germe pour l'évaluation de l'activité bactéricide des désinfectants chimiques pour instruments utilisés en médecine humaine
Méthodes d'essai et exigences (Phase 2, Etape 2)

Essai partiel sur la souche *Acinetobacter baumannii*

I. Identification de l'échantillon

Nom du produit :	**Alkacide**
Numéro de lot :	2009.06.02.70
Fabricant :	ALKAPHARM Parc Biocitech - 102 avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE
Date de réception :	08/03/2011
Conditions de stockage :	A température ambiante
Diluant du produit recommandé par le fabricant :	Non précisé
Substance(s) active(s) :	Non précisée
Aspect du produit :	Liquide limpide bleu

Parc BIOCITECH : 102, route de Noisy - 93230 Romainville - FRANCE
tél. : 33 (1) 41 50 59 89 - fax : 33.(1) 41 50 05 06 - www.scientis.fr

II. Principe de l'essai

L'essai selon la méthodologie de la norme NF EN 14561 (2007) adaptée à l'inox a pour but de mettre en évidence une réduction du nombre de microorganismes, lorsque ceux-ci sont mis au contact du produit à l'essai, dans les conditions spécifiées ci-dessous.

Une suspension bactérienne est mélangée à une substance interférente et étalée sur un porte microorganisme de 2cm de diamètre en acier inoxydable (304L). Le support, une fois séché, est plongé dans le produit à tester pendant le temps de contact défini.
Cet essai permet de déterminer une activité bactéricide, dans le domaine d'application, si le taux de réduction est de 10^5 ou plus.

III. Résultats d'essai

NF EN 14561 (2007) **Alkacide** Lot : 2009.06.02.70

Période d'essai : 15/03/2011 au 17/03/2011

Diluant du produit : Eau dure à 375 mg/kg de $CaCO_3$

Méthode par dilution –neutralisation

Neutralisant : Lécithine (3g/l) ; Polysorbate 80 (30g/l) ; Thiosulfate de sodium (5g/l) ; L-histidine (1g/l) ; Saponine (30g/l) ; Tryptone chlorure de sodium (qsp 1l)

Dénombrement en profondeur

Gélose de dénombrement : T.S.A.

Souche testée : *Acinetobacter baumannii* CIP 103572

Température d'essai : 20°C

Température d'incubation : 37°C

Porte microorganimes : Disques d'acier inoxydable (304L) de 2cm de diamètre

Substances interférentes: **Conditions de propreté** (albumine bovine 0,3g/l)

Temps de contact additionnel : **15 minutes**

Aspect des dilutions du produit : Incolores

Stabilité des mélanges : Mélanges stables

a. Validation et témoins

Souche (Collection et numéro)	Suspension de validation (N_{v0})	Témoin de conditions expérimentales (A)	Témoin de neutralisant (B)	Validation de la méthode (C)
Acinetobacter baumannii CIP 103572	94	87,5	83,5	47,5

Critères de validation :
N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml
A, B et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x N_{v0}

La méthode par dilution-neutralisation est validée à la concentration de 1% dans les conditions de l'essai.

b. Suspension d'essai, témoin eau

Souche (Collection et numéro)	*Acinetobacter baumannii* CIP 103572
Suspension d'essai (N)	$4,0 \times 10^9$
Lg N	9,6

Critères de validation :
N est compris entre $1,5 \times 10^9$ UFC/ml et 5×10^9 UFC/ml
$9,17 \leq \lg N \leq 9,7$

Souche (Collection et numéro)	*Acinetobacter baumannii* CIP 103572
Témoin eau (Nw)	$5,9 \times 10^7$
Lg Nw	7,8

Critères de validation :
$7,15 \leq \lg Nw \leq \lg N - 1,3$

c. Essai

		Nombre de cellules viables dans l'essai (Na) et taux de réduction (R) aux concentrations de produit testées		
Souche (Collection et numéro)		0,1%(v/v)	0,5%(v/v)	1%(v/v)
Acinetobacter baumannii CIP 103572	Na	>3,3 x 10^6	4950	180
	lg Na	>6,5	3,7	2,3
	lg R	**<1,3**	**4,1**	**5,5**

Calcul du taux de réduction (R)
lg R = lg N_w - lg Na
Une concentration est bactéricide si lgR ≥ 5

IV. Conclusion

Le produit **Alkacide, lot 2009.06.02.70,** est conforme à la méthodologie de la norme EN 14561 adaptée sur support inox. Il présente une activité bactéricide sur la souche *Acinetobacter baumannii* à la concentration de 1%, en présence de conditions de propreté, à 20°C et en 15 minutes de contact.

Romainville, le 21 mars 2011

Corinne BENOLIEL
Docteur en pharmacie
Directrice scientifique

Institut de
Recherche
Microbiologique

RAPPORT D'ESSAI

N°288/0612-2

DELIVRE A : **ALKAPHARM**
Parc Biocitech
102 avenue Gaston Roussel
93230 ROMAINVILLE

PRODUIT NETTOYANT : **ALKAZYME**

PRODUIT DESINFECTANT : **ALKACIDE**

DEMANDE D'ESSAI DU : 22 juin 2012

REFERENCE PRODUITS : 288/0612

ESSAI : Evaluation de la capacité d'un nettoyage suivi d'une désinfection destinée à éliminer des micro-organismes

Essai sur les souches *Staphylococcus aureus* méthicilline résistant (MRSA) CIP 103811, *Pseudomonas aeruginosa* résistant à l'imipenem (PARI) CIP 105 521, *Aspergillus niger* DSM 1988 et sur les spores de *Bacillus subtilis* CIP 52.62 et sur 3 types de supports différents

Ce rapport comporte 4 pages

Il ne concerne que le produit soumis à l'essai

Date d'émission : 24 septembre 2012

Amandine CARRE
Microbiologiste
Responsable des Essais

Philippe STROHL
Docteur Vétérinaire
Directeur Scientifique

I. IDENTIFICATION DE L'ECHANTILLON

Nom du produit	ALKAZYME	ALKACIDE
Numéro du lot	2011.07.01.61	2012.04.01.44
Fabricant	ALKAPHARM Parc Biocitech 102 avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE	
Date de péremption	non précisé	non précisé
Diluant de produit dont l'utilisation est recommandée	eau du réseau	eau du réseau
Aspect du produit et de ses dilutions	Poudre blanche	Liquide limpide bleu
Substances actives et concentrations	non indiqué	non indiqué

Date de réception : 25 juin 2012

Conditions de stockage : à température ambiante, susceptible d'être exposé à la lumière

II. CONDITIONS EXPERIMENTALES

Période d'analyse : du 23 juillet au 09 aout 2012

Conditions expérimentales et protocole de dénombrement issus de la norme NF T 72-281 (mai 2009)

Identification des souches bactériennes :

Staphylococcus aureus méthicilline résistant (MRSA) CIP 103.811	Gélose Tryptone Soja Agar incubation 48 heures à 37 ± 1°C
Pseudomonas aeruginosa résistant à l'imipenem (PARI) CIP 105 521	Gélose Tryptone Soja Agar incubation 48 heures à 37 ± 1°C

Identification de la souche de moisissure :

Aspergillus brasiliensis DSM 1988	Gélose à l'Extrait de Malt incubation 72 heures à 30 ± 1°C

Identification des souches de spores bactérienne :

Bacillus subtilis CIP 52.62	Gélose Tryptone Soja Agar incubation 72 heures à 30 ± 1°C

Supports testés :

Tuyau souple : Tube en PVC pour perfuseur

Tuyau rigide : Tube en acier inoxydable de 5 mm de diamètre

Support plat : Disque plat en acier inoxydable de 2 cm de diamètre

Substance interférente : condition de saleté issue des normes NF EN 14561 (mars 2007) et NF EN 14562 (septembre 2006)

Composition : 3,0 g/L d'albumine bovine et 3,0 mL/L d'érythrocytes de mouton en final lors de l'essai.

Température d'essai : entre 18 et 25°C

Diluant de produit utilisé pendant l'essai : eau dure à 375 mg/kg de $CaCO_3$ (eau simulant l'eau du réseau)

Méthodologie pour chaque souche et chaque support testés :

1. Préparation d'un inoculum et mélange au 1/10ème avec la substance interférente afin d'obtenir un dépôt final d'au moins 10^6 UFC/support après séchage,
2. Dépôt de 0,05 ml de ce mélange sur le support (essai en simple) et séchage,
3. Préparation d'une solution à 0,5 %(m/v) d'**ALKAZYME** en eau dure,
4. Immersion du support contaminé dans 100 ml de la solution,
5. Grattage du support pour décoller l'inoculum,
6. Mise en contact 15 minutes et rinçage avec 10 ml d'eau dure stérile,
7. Préparation d'une solution d'**ALKACIDE** à 2 %(m/v) en eau dure,
8. Immersion des supports préalablement traités par **ALKAZYME** pendant 15 minutes dans 100 ml de la solution,
9. Rinçage avec 10 ml d'eau dure stérile,
10. Quantification des micro-organismes survivant sur le support et dans le bain après désinfection
11. Calcul de la différence de réduction logarithmique entre la quantité de micro-organismes présents sur le support avant le traitement et après le traitement.

III. RES ULTATS DES ESSAIS

Type de supports	Contamination du support avant traitement (UFC/ support)	Contamination du support après traitement (UFC/ support)	Réduction logarithmique due au traitement
Staphylococcus aureus **méthicilline résistant (MRSA) CIP 103.811**			
Tuyau souple	$2,3 \times 10^6$	0	**6,36**
Tuyau rigide	$2,3 \times 10^6$	0	**6,36**
Support plat	$2,2 \times 10^6$	0	**6,34**
Pseudomonas aeruginosa **résistant à l'imipenem (PARI) CIP 105 521**			
Tuyau souple	$1,9 \times 10^6$	0	**6,28**
Tuyau rigide	$1,8 \times 10^6$	0	**6,26**
Support plat	$1,7 \times 10^6$	0	**6,23**
Aspergillus brasiliensis **DSM 1988**			
Tuyau souple	$1,3 \times 10^6$	0	**6,11**
Tuyau rigide	$1,3 \times 10^6$	0	**6,11**
Support plat	$1,3 \times 10^6$	0	**6,11**
Bacillus subtilis **CIP 52.62**			
Tuyau souple	$1,4 \times 10^6$	0	**6,15**
Tuyau rigide	$1,2 \times 10^6$	0	**6,08**
Support plat	$1,3 \times 10^6$	0	**6,11**

IV. CONCLUSION

Aucun microorganisme survivant des souches de référence *Staphylococcus aureus* méthicilline résistant (MRSA) CIP 103.811, *Pseudomonas aeruginosa* résistant à l'imipenem (PARI) CIP 105 521, *Aspergillus brasiliensis* DSM 1988 et *Bacillus subtilis* CIP 52.62 n'a été retrouvé sur les supports nettoyés avec le produit **ALKAZYME** puis désinfectés avec le produit **ALKACIDE** conformément au protocole décrit, qu'ils soient plats ou tubulaires, en acier inoxydable ou matière plastique.

FIN DU RAPPORT D'ESSAI

RAPPORT D'ESSAI
009-1 REA 08 CI1

Essai selon la norme NF EN 13624 (Avril 2004)

Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide des désinfectants chimiques utilisés pour les instruments en médecine.

Méthodes d'essai et exigences (Phase 2, étape1)

I. Identification de l'échantillon

Nom du produit :	**ALKACIDE**
Numéro de lot :	2007.05.01.63
Fabricant :	ALKAPHARM Parc Biocitech – 102 Avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE
Date de réception :	/
Conditions de stockage :	A température ambiante et à l'abri de la lumière
Diluant du produit recommandé par le fabricant :	Non précisé
Substance(s) active(s) :	Non précisée
Aspect du produit :	Liquide limpide bleu

Parc BIOCITECH : 102, route de Noisy - 93230 Romainville - FRANCE
tél. : 33 (1) 41 50 59 89 - fax : 33 (1) 41 50 05 06 - www.scientis.fr

II. Principe de l'essai

L'essai selon la norme NF EN 13624 (2004) a pour but de mettre en évidence une réduction du nombre de microorganismes, lorsque ceux-ci sont mis au contact du produit à l'essai, dans les conditions spécifiées ci-dessous.

Cet essai réalisé en suspension permet de déterminer une activité fongicide ou levuricide si le taux de réduction est de 10^4 ou plus. La concentration efficace ainsi déterminée convient à des situations pratiques d'utilisation.

III. Résultats d'essai

NF EN 13624 (2004) **ALKACIDE** Lot : 2007.05.01.63

Période d'essai : 27/08/08 au 29/08/08

Diluant du produit : Eau dure à 375 mg/kg de $CaCO_3$

Méthode par dilution –neutralisation

Neutralisant : Diluant Pharmacopée + Neutralisant (VWR)

Dénombrement en profondeur

Température d'essai : 20°C

Température d'incubation : 30°C

Temps de contact: **15 minutes**

Microorganisme d'essai : *Candida albicans* ATCC 10231

Substances interférentes :
Conditions de saleté (albumine bovine 3g/l + érythrocytes de mouton 3g/l)

Aspect des dilutions du produit : Incolores à légèrement bleues

Stabilité des mélanges : mélanges stables

a. Validation et témoins

Souche (Collection et numéro)	Suspension de validation (N_v)	Suspension de validation (N_{v0})	Témoin de conditions expérimentales (A)	Témoin de neutralisant (B)	Validation de la méthode (C)
Candida albicans ATCC 10231	780	78	68	72,5	63

N_v est compris entre $4,5 \times 10^2$ et $1,8 \times 10^3$ UFC/ml
N_{v0} est compris entre 45 et 180 UFC/ml
A, B et C sont supérieurs ou égaux à $0,5 \times N_{v0}$

La méthode est validée dans les conditions de l'essai.

b. Suspension d'essai

Souche (Collection et numéro)	Suspension d'essai (N)	lg N	N_0 (= N / 10)	lg N_0
Candida albicans ATCC 10231	2×10^7	7,3	2×10^6	6,3

N est compris entre $1,5 \times 10^7$ et $5,0 \times 10^7$ UFC/ml
N_0 est compris entre $1,5 \times 10^6$ et $5,0 \times 10^6$ UFC/ml

c. Essai

		Nombre de cellules viables (Na) et taux de réduction (R) aux concentrations de produit testées			
Souche (Collection et numéro)		0,05%(v/v)	0,1%(v/v)	1%(v/v)	2%(v/v)
Candida albicans ATCC 10231	Na	>3300	<140	<140	<140
	lg Na	>3,5	<2,2	<2,2	<2,2
	lg R	**<2,8**	**>4,1**	**>4,1**	**>4,1**

lg R = lg N_0 - lg Na
Une concentration est levuricide si lgR ≥ 4

IV. Conclusion

Le produit **ALKACIDE** est conforme à la norme NF EN 13624. Il présente une activité levuricide en conditions de saleté, à 20°C et en 15 minutes de contact à la concentration de 0,1% (v/v).

Romainville, le 21/07/2010

Corinne BENOLIEL
Docteur en pharmacie
Directrice scientifique

RAPPORT D'ESSAI
131-1REA10

Essai selon la méthodologie de la norme NF EN 14562 (Septembre 2006)
Adaptation à un support en acier inoxydable
Essai quantitatif de porte germe pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide des désinfectants chimiques pour instruments utilisés en médecine humaine
Méthodes d'essai et exigences (Phase 2, Etape 2)

Essai partiel sur *Candida albicans*

I. Identification de l'échantillon

Nom du produit :	**Alkacide**
Numéro de lot :	2007.10.01.63
Fabricant :	ALKAPHARM Parc Biocitech - 102 avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE
Date de réception :	14/10/2008
Conditions de stockage :	A température ambiante
Diluant du produit recommandé par le fabricant :	Non précisé
Substance(s) active(s) :	Non précisée
Aspect du produit :	Liquide limpide bleu clair

Parc BIOCITECH : 102, route de Noisy - 93230 Romainville - FRANCE
tél. : 33 (1) 41 50 59 89 - fax : 33 (1) 41 50 05 06 - www.scientis.fr

II. Principe de l'essai

L'essai selon la méthodologie de la norme NF EN 14562 (2006) adaptée à l'inox a pour but de mettre en évidence une réduction du nombre de microorganismes, lorsque ceux-ci sont mis au contact du produit à l'essai, dans les conditions spécifiées ci-dessous.

Une suspension fongique est mélangée à une substance interférente et étalée sur un porte microorganisme de 2cm de diamètre en acier inoxydable (304L). Le support, une fois séché, est plongé dans le produit à tester pendant le temps de contact défini.
Cet essai permet de déterminer une activité fongicide ou lévuricide, dans le domaine d'application, si le taux de réduction est de 10^4 ou plus.

III. Résultats d'essai

NF EN 14562 (2006) **Alkacide** Lot : 2007.10.01.63

Période d'essai : 25/08/2010 au 27/08/2010

Diluant du produit : Eau dure à 375 mg/kg de $CaCO_3$

Méthode par dilution –neutralisation

Neutralisant : Diluant Pharmacopée Européenne + Neutralisant

Dénombrement en profondeur

Gélose de dénombrement : Gélose au Malt

Souches testées : *Candida albicans* ATCC 102.31

Température d'essai : 20°C

Température d'incubation : 30°C

Porte microorganimes : Disques d'acier inoxydable (304L) de 2cm de diamètre

Substances interférentes: **Conditions de propreté** (albumine bovine 0,3g/l)

Temps de contact additionnel : **15 minutes**

Aspect des dilutions du produit : Incolores à bleues

Stabilité des mélanges : Mélanges stables

a. Validation et témoins

Souche (Collection et numéro)	Suspension de validation (N_{v0})	Témoin de conditions expérimentales (A)	Témoin de neutralisant (B)	Validation de la méthode (C)
Candida albicans ATCC 102.31	140,5	119,5	118	153

Critères de validation :
N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml
A, B et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x N_{v0}

La méthode par dilution-neutralisation est validée dans les conditions de l'essai.

b. Suspension d'essai, témoin eau

Souche (Collection et numéro)	*Candida albicans* ATCC 102.31
Suspension d'essai (N)	$4,8 \times 10^8$
Lg N	8,7

Critères de validation :
N est compris entre $1,5 \times 10^8$ UFC/ml et 5×10^8 UFC/ml
$8,17 \leq \lg N \leq 8,7$

Souche (Collection et numéro)	*Candida albicans* ATCC 102.31
Témoin eau (Nw)	$1,4 \times 10^7$
Lg Nw	7,2

Critères de validation :
$6,15 \leq \lg Nw \leq \lg N - 1,3$

c. Essai

		Nombre de cellules viables dans l'essai (Na) et taux de réduction (R) aux concentrations de produit testées		
Souche (Collection et numéro)		0,1%(v/v)	1%(v/v)	2%(v/v)
Candida albicans ATCC 102.31	Na	>3,3 x 10^6	3,0 x 10^3	<140
	lg Na	>6,5	3,5	<2,2
	lg R	**<0,7**	**3,7**	**>5,0**

Calcul du taux de réduction (R)
lg R = lg N_w - lg Na
Une concentration est fongicide ou levuricide si lgR ≥ 4

IV. Conclusion

Le produit **Alkacide, lot 2007.10.01.63,** est conforme à la méthodologie de la norme EN 14562 adaptée sur support inox. Il présente une activité levuricide sur la souche *Candida albicans* à la concentration de 2%, en présence de conditions de propreté, à 20°C et en 15 minutes de contact.

Romainville, le 23 septembre 2010

Corinne BENOLIEL
Docteur en pharmacie
Directrice scientifique

Institut de
Recherche
Microbiologique

TEST REPORT

N°288/0612-1/M1

ISSUED TO: **ALKAPHARM**
Parc Biocitech
102 avenue Gaston Roussel
93230 ROMAINVILLE

CLEANER PRODUCT: **ALKAZYME**

DESINFECTANT PRODUCT: **ALKACIDE**

TEST REQUEST DATE: 29 August 2012

PRODUCT REFERENCE: 288/0612

TEST: **Evaluation of the ability of a two-step cleansing/disinfecting process to eliminate microorganisms**

Test on strains methicillin résistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CIP 103811, *Aspergillus brasiliensis* DSM 1988 and on spores of *Bacillus subtilis* CIP 52.62. Test on 3 types of supports

This report contains 6 pages

This report applies only to the product submitted to test

Issue date: 24 September 2012

Re-issue date : 21 March 2013

Only the french version is valid / seule la version française fait foi

Philippe STROHL
Doctor of veterinary medicine
Scientific Director

I. SAMPLE IDENTIFICATION

Product name:	**ALKAZYME**	**ALKACIDE**
Lot number	2011.07.01.61	2012.04.01.44
Manufacturer	ALKAPHARM Parc Biocitech 102 avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE	
Expiration date	not indicated	not indicated
Recommended product diluent:	tap water	tap water
Aspect of product and its dilutions	White powder	Blue clear liquid
Active substances and concentrations	not indicated	not indicated

Reception date: 25 June 2012

Storage conditions: at room temperature with possible exposure to light

II. EXPERIMENTAL CONDITIONS

Analysis period: from 23 July to 09 August 2012

Experimental conditions and count protocol derived from standard NF T 72-281 (May 2009)

Identification of bacterial strain:
methicillin résistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CIP 103.811 | Trypton Soy Agar
incubation 48 hours at 37 ± 1°C

Identification of fungal strain:
Aspergillus brasiliensis DSM 1988

Malt Extract Agar
incubation 72 hours at 30 ± 1°C

Identification of spore of bacteria :
Bacillus subtilis CIP 52.62

Trypton Soy Agar
incubation 72 hours at 30 ± 1°C

Tested supports:

Supple tubing:	PVC infusion tube
Rigid tubing:	Stainless steel tubing, diameter 5 mm
Flat support:	Stainless steel disk, diameter 2 cm

Interfering substance: dirty conditions derived from standards NF EN 14561 (march 2007) and EN 14562 (September 2006)

Composition: final concentration during the test of 3 g/L of bovine albumin and 3 ml/L of washed sheep erythrocytes

Product diluent used during the test: hard water at 375 mg/kg of CaCO3 (simulated tap water)

Test temperature: between 18 and 25°C

Procedures for each tested strain and support:

1. An inoculum is prepared and mixed one part to nine with the interfering substance to obtain a final deposit of at least 10^6 CFU/support after drying.
2. 0.05 ml of the mix is deposited on the support (single test) and dried.
3. A 0.5% (m/v) solution of **ALKACIDE** is prepared using hard water.
4. The contaminated support is immersed in 100 ml of the solution.
5. The support is scraped to liberate the inoculum.
6. After 15 minutes of the cleansing bath, the support is rinsed with 10 ml of sterile hard water.

⇨ **The microorganisms remaining on the support and in the cleansing bath are counted.**

7. A 2% (m/v) solution of **ALKACIDE** is prepared using hard water.
8. The supports previously cleansed with **ALKACIDE** are immersed in 100 ml of the **ALKACIDE** solution for a 15-minute disinfection bath.
9. They are then rinsed with 10 ml of sterile hard water.

⇨ **The living microorganisms remaining on the support and in the disinfection bath are counted.**

The results obtained at each step are compared to control supports. These latter are treated identically but with a non-bactericidal solution of 0.5% (w/v) Tween 80 at the cleansing step and sterile hard water at the disinfecting step.

III. TES T RESULTS

1. *Aspergillus brasiliensis* DSM 1988

	Test		Control		Log reduction in comparison to the initial contamination of the support
	Bath (CFU / 100 ml)	**Support (CFU / support)**	**Bath (CFU / 100 ml)**	**Support (CFU / support)**	
Rigid tubing – initial contamination: 1.3 x 10^6 CFU/support					
Number of surviving microorganisms after cleansing bath	9,0 x 10^2	24	1,1 x 10^6	32	**6.11**
Number of surviving microorganisms after cleansing bath and disinfection bath	0	0	8	8	
Flat support– initial contamination: 1.3 x 10^6 CFU/support					
Number of surviving microorganisms after cleansing bath	1,6 x 10^3	0	1,2 x 10^6	11	**6.11**
Number of surviving microorganisms after cleansing bath and disinfection bath	0	0	10	6	
Supple tubing– initial contamination: 2.3 x 10^6 CFU/support					
Number of surviving microorganisms after cleansing bath	1,4 x 10^3	0	1,2 x 10^6	80	**6.11**
Number of surviving microorganisms after cleansing bath and disinfection bath	0	0	7	58	

2. *Staphylococcus aureus* méthicilline résistant (MRSA) CIP 103.811

	Test		Control		Log reduction in comparison to the initial contamination of the support
	Bath (CFU / 100 ml)	Support (CFU / support)	Bath (CFU / 100 ml)	Support (CFU / support)	
Rigid tubing – initial contamination: 2.3×10^6 CFU/support					
Number of surviving microorganisms after cleansing bath	0	0	$1,7 \times 10^6$	$1,2 \times 10^3$	**6.36**
Number of surviving microorganisms after cleansing bath and disinfection bath	0	0	98	$1,1 \times 10^2$	
Flat support– initial contamination: 2.3×10^6 CFU/support					
Number of surviving microorganisms after cleansing bath	0	0	$2,1 \times 10^6$	$7,1 \times 10^2$	**6.36**
Number of surviving microorganisms after cleansing bath and disinfection bath	0	0	$1,9 \times 10^3$	$1,1 \times 10^2$	
Supple tubing– initial contamination: 2.2×10^6 CFU/support					
Number of surviving microorganisms after cleansing bath	0	0	$1,9 \times 10^6$	$8,0 \times 10^2$	**6.34**
Number of surviving microorganisms after cleansing bath and disinfection bath	0	0	$1,5 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	

3. *Bacillus subtilis* CIP 52.62

	Test		Control		Log reduction in comparison to the initial contamination of the support
	Bath (CFU / 100 ml)	Support (CFU / support)	Bath (CFU / 100 ml)	Support (CFU / support)	
Rigid tubing – initial contamination: 1.4×10^6 CFU/support					
Number of surviving microorganisms after cleansing bath	$4,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10^2$	**6.15**
Number of surviving microorganisms after cleansing bath and disinfection bath	0	0	$1,7 \times 10^2$	37	
Flat support– initial contamination: 1.2×10^6 CFU/support					
Number of surviving microorganisms after cleansing bath	$4,7 \times 10^5$	74	$1,1 \times 10^6$	$3,4 \times 10^2$	**6.08**
Number of surviving microorganisms after cleansing bath and disinfection bath	0	0	$2,0 \times 10^2$	93	
Supple tubing– initial contamination: 1.3×10^6 CFU/support					
Number of surviving microorganisms after cleansing bath	$3,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^6$	$2,2 \times 10^2$	**6.11**
Number of surviving microorganisms after cleansing bath and disinfection bath	0	0	$2,1 \times 10^2$	65	

IV. CONCLUSION

No surviving bacteria of the reference strain méthicillin résistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CIP 103.811, *Aspergillus brasiliensis* DSM 1988 and *Bacillus subtilis* CIP 52.62 were found on the supports cleansed with the product **ALKAZYME** then disinfected with the product **ALKACIDE**, regardless of form (tubular or flat) or material (plastic or steel), in accordance with the described protocol.

In contrast, surviving microorganisms from the three tested genera were found on the control supports, despite surfactant and mechanical cleansing.

Similarly, no living microorganisms were found in the disinfection bath containing the product **ALKACIDE**, used in accordance with the described protocol. This is in contrast to the control disinfection baths, in which the tested microorganisms were still present.

END OF TEST REPORT

TEST REPORT

VIRUCIDAL QUANTITATIVE SUSPENSION TEST USING ADENOVIRUS ON ALKACIDE PRODUCT

For: **ALKAPHARM**
PARC BIOCITECH
102 AVENUE GASTON ROUSSEL
93230 ROMAINVILLE

Study number: n°053V47-2011

VIRUCIDAL TESTS:

According to the European standard EN 14476+A1 (January 2007) – chemical antiseptics and disinfectants – virucidal quantitative suspension tests for chemical disinfectants and antiseptics used in human medecine.

Tests using the ALKACIDE product against the adenovirus VR-5, adenoid strain 75.

This test report included 13 pages.

Study completion date: 05-09-2011

Stephanie MOROT-BIZOT
PhD in microbiology
Study director

Professeur Georges HERBEIN
MD-PhD in virology – Professor of medicine
Scientific consultant

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 Besançon
Tél : 03 81 25 09 04 Fax : 03 81 25 53 51
info@apexbiosolutions.com
N° SIRET 517 860 532 00012 – RCS Besançon
N° TVA intra FR 23517860532
SARL au capital de 10 000 €

SUMMARY

1. PERFORMING LABORATORY
2. PRODUCT IDENTITY
3. EXPERIMENTAL CONDITIONS
4. VALIDATIONS
5. VIRUCIDAL ASSAYS
6. CONCLUSIONS
7. TECHNICAL APPENDIX

18, rue Alain SAVARY - 25000 Besançon ▪ Tel: 03.81.25.09.04 ▪ Fax: 03.81.25.53.51▪ SARL au capital de 10 000 € ▪ RCS BESANÇON ▪ N° SIRET 51786053200012 ▪ N° TVA intra FR 23517860532 ▪ info@apexlabo.com

1 PERFORMING LABORATORY

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 Besançon

2 PRODUCT IDENTITY

ALKACIDE

Batch number: 20-04/2008-04
Expiration date: 2012.06
Manufacturer: ALKAPHARM
Storage conditions: room temperature
Active substances: didecyldimethylammonium chloride < 2,5% ; 2,50% < glutaraldehyde < 10%
Appearance of the product: clear, blue.
Product diluent recommended by the manufacturer: tap water
Date of delivery of the product: 03-17-2011
Date of tests: from 03-28-2011 to 05-01-2011

3 EXPERIMENTAL CONDITIONS

Temperature used during the assays: 20°C ± 1°C
Titration units: log $TCID_{50}$
Exposure Time: 15 minutes
Diluent used for the product: sterile carbonated water
Viral strain: adenovirus type 5, adenoïd strain 75 (ATCC VR5), grown on HEp-2 cells, at 37°C, under 5% CO2 atmosphere
Organic soil load: 0,3 g/l bovine albumine sera
Product stability: blue turbid solution with organic soil load
Stop solution: cold shock

Viral titer:

Viral titers are expressed in log $TCID_{50}$ per ml, according to the SPEARMAN-KÄRBER method. Titer of adenovirus suspension assay = 8,00 log $TCID_{50}$.

4 VALIDATIONS

a) Methodology

The HEp-2 cells were exposed to the ALKACIDE product and a weak cytotoxic effect was observed at the dilution 10^{-3}.

b) Sensibility assays

The adenovirus was titrated on cell cultures untreated with the ALKACIDE product (indicator cell line), and titrated on cell cultures treated with the ALKACIDE product.

	Viral titer (log $TCID_{50}$)		
Product dilution	Untreated cell cultures	Treated cell cultures	**Difference of viral titer**
ALKACIDE 10^{-4}	7,875	7	**0,875**

According to the European standard EN 14476 + A1, the ALKACIDE product used at the dilution of 10^{-4} does not have an effect on the adenovirus titration method (the difference between viral titers must be < 1,0 log).

c) Validations of the cold shock method on the virucidal effect of the ALKACIDE product

Product Concentration	**Organic soil load**	**Viral titer (log $TCID_{50}$)**	**Difference with the viral suspension assay**
ALKACIDE 5 %	0,3 g/l BSA	Trial 1 : 7,875	0,125
		Trial 2 : 7,625	0,375

The method is validated for a difference in viral titers ≤ 0,5 log.

d) Inactivation assays of the virus with a control solution (1,4 % formaldehyde)

	Viral titer (log $TCID_{50}$)	**Viral titer reduction (log $TCID_{50}$)**
Viral suspension control	7,75	
With 1,4%formaldehyde		
Inactivation exposure 5 min	6,875	0,875
Inactivation exposure 15 min	6,125	1,625
Inactivation exposure 30 min	5,375	**2,375**

The viral titer reduction (difference between the titers of the viral suspension treated with 1,4 %

formaldehyde and the viral suspension control) must be between -0,5 and -2,5 log after 30 min of exposure. In the assays, the viral titer reduction is 2,375 log, indicated that the adenovirus is inactivated after 30 min of exposure with the 1,4 % formaldehyde solution.

5 VIRUCIDAL ASSAYS

Trial 1

The viral test suspension was titrated at 7,875 log $TCID_{50}$ prior the assays on ALKACIDE product (5 % - 2 % and 0,50 %).

PRODUCT	Concentration (v/v)	Time exposure	Temperature	Viral titer (log $TCID_{50}$)	Viral titer reduction
ALKACIDE	5 %	15 min	20°C	2,50	**5,375**
	2%	15 min	20°C	2,875	**5,00**
	0,50 %	15 min	20°C	6,50	**1,375**

Trial 2

The viral test suspension was titrated at 7,625 log $TCID_{50}$ prior the assays on ALKACIDE product (5 % - 2 % and 0,50 %).

PRODUCT	Concentration (v/v)	Time exposure	Temperature	Viral titer (log $TCID_{50}$)	Viral titer reduction
ALKACIDE	5 %	15 min	20°C	2,375	**5,25**
	2%	15 min	20°C	3,00	**4,625**
	0,50 %	15 min	20°C	6,375	**1,25**

The concentrations of the product demonstrated a virucidal activity on the virus tested if the viral titer reduction is $\geq$ 4,0 log.

6 CONCLUSIONS

The assays were validated as required by the European standard EN 14476+A1:

- The viral titers of the suspension tests were sufficient in order to observe a reduction of 4 log after time exposure with the product. The viral titer of the adenovirus was of 8,00 log $TCID_{50}$.

- The virus was inactivated with the control solution of 1,4 % formaldehyde after 30 min of exposure : the reduction observed was of 2,375 log for the adenovirus.

- The ALKACIDE product does not have a cytotoxic effect on the HEp-2 cells.

- The ALKACIDE product does not affect the infectious capacity of the virus: the differences in viral titers between the virus inoculated on HEp-2 cells and the virus inoculated on the HEp-2 cells treated with the ALKACIDE was ≤ 1,0 log (0,875 log).

- The difference between the viral suspension assay titer and the viral suspension titer in the cold shock validation was ≤ 0,5 log (0,125 log $TCID_{50}$ trial 1, and 0,375 log $TCID_{50}$ trial 2)

- The trials in clean conditions (0,3 g/l BSA) does not affect the infectious capacity of the virus

7 CONCLUSIONS

The assays performed with ALKACIDE product demonstrated that:

- **the ALKACIDE product demonstrated a virucidal activity on the adenovirus from the concentration 2% and 5%,** as required by the European standard EN 14476+A1, following a **15 minutes** exposure period, at 20°C, in clean conditions.

TECHNICAL APPENDIX 1

Cell line: HEp-2 cells (RD-Biotech réf. 84011, lot n°110315-118)

Viral strain: adenovirus type 5, adenoïd 75 strain (ATCC réf. VR-5, lot n°3679877)

Buffer and reagents:

- Buffer PBS: sodium chloride, Panreac, réf. 141659.1211, lot n° 0000204679; sodium phosphate dibasic, Sigma Aldrich, réf. S5136, lot n° BCBC7067V; sodium phosphate monobasic, Sigma Aldrich, réf. S5011, lot n° 1019K01021V
- MEM media, PAN Biotech, réf. P03-2310, lot n° 1330-1/34
- DMEM media, Sigma Aldrich, réf. D5796, lot n° RNBB6646
- Fetal calf serum, Dutscher, lot n° S05491S0750

Organic soil load:

- Bovine albumin serum (powder), Sigma Aldrich, réf. 05479, lot n° STBB7838V

Inactivation solution:

Formaldehyde, Sigma Aldrich, réf. F-1635, lot n° BCBB3510

ANNEXE 2

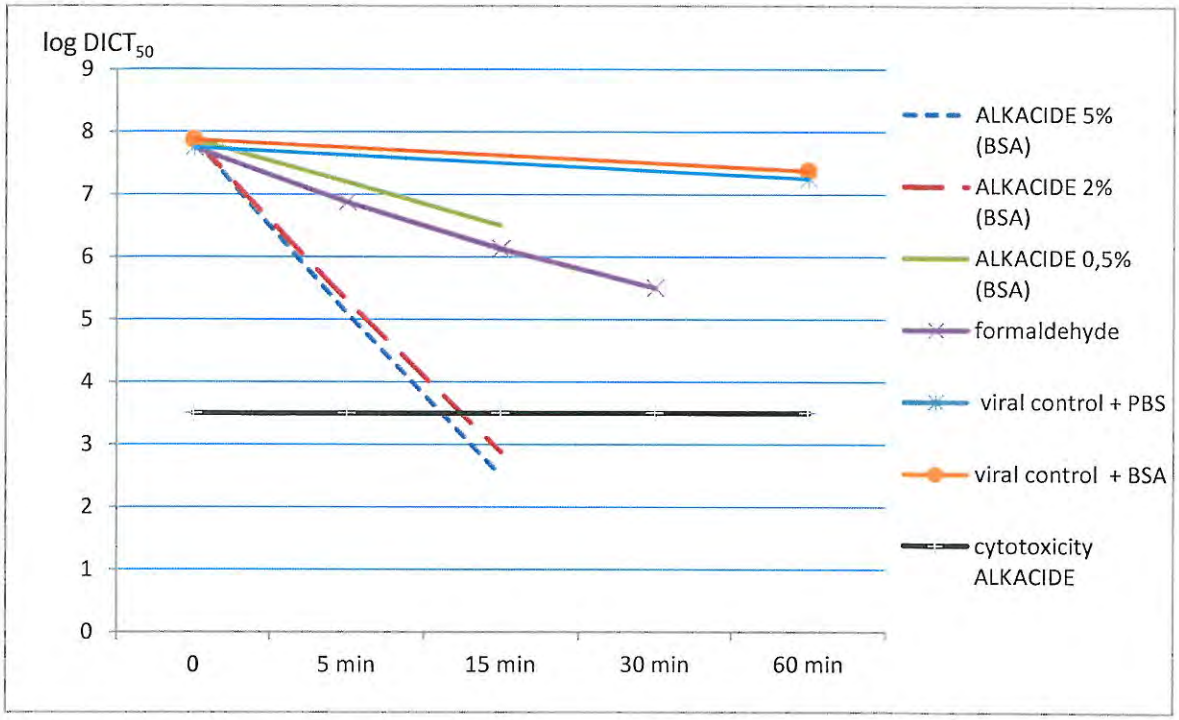
Table A1 - Titration of adenovirus by cytopathic effect, with the Spaerman-Kärber method :

log $TCID_{50}$ = 8,00

Dilution (- log)	Results	% positive results
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	33333333	100
-6	33333322	100
-7	20210121	75
-8	11011010	62,5
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Sum of the positives results		537,5

Fig.1- Chart of the results:

Trial 1



Trial 2

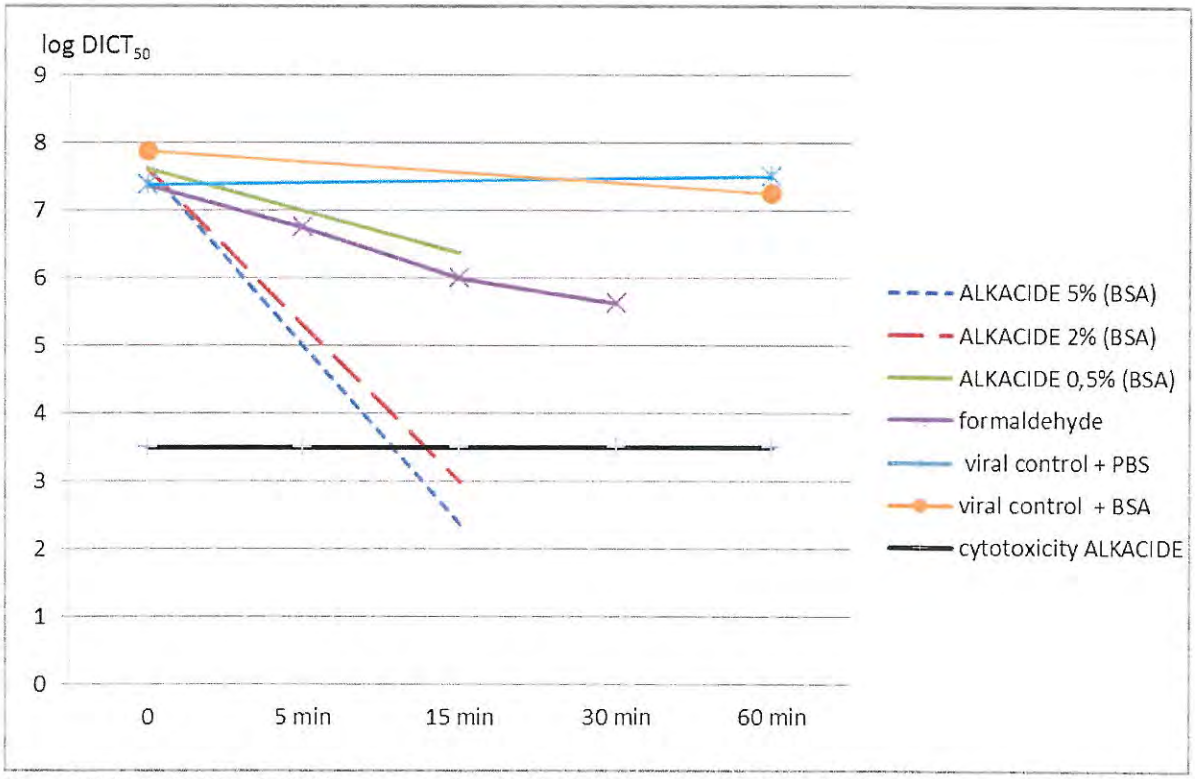


Table A2 — results for the ALKACIDE product and the adenovirus in clean conditions (0,3 g/l BSA)

Product	Concentration	Organic soil load	Cytotoxicity level	Log $TCID_{50}$					Reduction > 4 log after
				0	5 min	15 min	30 min	60 min	
ALKACIDE trial 1	5,00%	0,3 g/l BSA	3,5	7,875	N.T.	2,5	N.T.	N.T.	15 min R = 5,375
	2,00%	0,3 g/l BSA	3,5	7,875	N.T.	2,875	N.T.	N.T.	15 min R = 5
	0,50%	0,3 g/l BSA	3,5	7,875	N.T.	6,5	N.T.	N.T.	15 min R = 1,375
ALKACIDE trial 2	5,00%	0,3 g/l BSA	3,5	7,625	N.T.	2,375	N.T.	N.T.	15 min R = 5,25
	2,00%	0,3 g/l BSA	3,5	7,625	N.T.	3	N.T.	N.T.	15 min R = 4,625
	0,50%	0,3 g/l BSA	3,5	7,625	N.T.	6,375	N.T.	N.T.	15 min R = 1,25
Formaldehyde Trial 1	1,40%	PBS	3,5	7,75	6,875	6,125	5,375	N.T.	
Formaldehyde Trial 2	1,40%	PBS	3,5	7,375	6,75	6	5,625	N.T.	
Infectivity control trial 1	N.A.	PBS	N.A.	7,75	N.T.	N.T.	N.T.	7,25	
Infectivity control trial 1	N.A.	0,3 g/l BSA	N.A	7,875	N.T.	N.T.	N.T.	7,375	
Infectivity control assay 2	N.A.	PBS	N.A	7,375	N.T.	N.T.	N.T.	7,5	
Infectivity control assay 2	N.A.	0,3 g/l BSA	N.A	7,875	N.T.	N.T.	N.T.	7,25	
Cells sensitivity to the virus	ALKACIDE	N.A.	Cells non treated	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7,875	
	10^{-4}	N.A.	Cells treated	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7	

N.A. : Non Applicable N.T. : Non Tested

Table A3 —Raw data for ALKACIDE product (0,3 g/l BSA) tested against the adenovirus (titration by cytopathic effect; 8 wells)

Trial 1

Product	Concen -tration	Organic soil load	Exposure time	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
ALKACIDE	5,00%	0,3 g/l BSA	15 min	4444	3322	2000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	3302	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	4444	3333	2022	1220	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	2222	0100	0000	0000
	2,00%	0,3 g/l BSA	15 min	4444	3230	0033	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	2222	3300	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	4444	3333	2022	1220	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	2222	0100	0000	0000
	0,50%	0,3 g/l BSA	15 min	4444	4444	4444	4444	3333	4303	1000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	2303	0100	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	4444	3333	2022	1220	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	2222	0100	0000	0000
ALKACIDE cytotoxicity	5,00%	0,3 g/l BSA	N.A.	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
Formaldehyde	1,40%	PBS	5	4444	4444	4444	4444	2222	1222	1100	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	2222	1111	1000	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	2211	0011	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	2222	1110	0000	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	3333	2200	0011	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	3333	2022	0000	0000	0000	0000	
Formaldehyde (cytotoxicity)	1,40%	PBS	N.A.	4444	4444	3333	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	4444	3223	0000						
Viral control of infectivity	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	3344	3333	0023	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4333	2030	2200	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	3333	2220	0011	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	0200	0000	0000	0000
Viral control of infectivity	N.A.	0,3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	1220	0011	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3322	1101	1110	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	3333	0001	0001	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	1000	0000	0000

Trial 2

Product	Concen -tration	Organic soil load	Exposure time	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
ALKACIDE	5,00%	0,3 g/l BSA	15 min	4444	2202	0001	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	0022	0100	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Témoin viral	4444	4444	4444	4444	3333	3333	0011	0220	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3330	1101	2220	0000	0000
	2,00%	0,3 g/l BSA	15 min	4444	2220	3022	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	2222	2200	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Témoin viral	4444	4444	4444	4444	3333	3333	0011	0220	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3330	1101	2220	0000	0000
	0,50%	0,3 g/l BSA	15 min	4444	4444	4444	4444	3333	2330	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	3333	0000	0000	0000	0000
			Témoin viral	4444	4444	4444	4444	3333	3333	0011	0220	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3330	1101	2220	0000	0000
ALKACIDE cytotoxicity	5,00%	0,3 g/l BSA	N.A.	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
Formaldehyde	1,40%	PBS	5	4444	4444	4444	4444	3322	1111	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	3333	1111	1100	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	3333	2220	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	3322	0020	0000	0000	0000	
			30	4444	4444	3344	3333	2222	1100	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	2222	1100	1000	0000	0000	0000	
Formaldehyde (cytotoxicity)	1,40%	PBS	N.A.	4444	4444	3333	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	4444	3223	0000						
Viral control of infectivity	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	3333	3333	0022	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	2333	0022	1110	0000	0000
			60	4444	4444	4444	3333	3222	0222	1110	0001	0000	0000
				4444	4444	4444	3333	2222	2222	0011	1101	0000	0000
Viral control of infectivity	N.A.	0,3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	1220	0011	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3322	1101	1110	0000	0000
			60	4444	4444	4444	3333	2233	2202	1001	0001	0000	0000
				4444	4444	4334	2333	3222	2221	1001	1200	0000	0000

Sensitivity of cells to the adenovirus:

Product	dilution	Organic soil load		Dilutions								
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
ALKACIDE	10^{-4}	0,3 g/l BSA	Untreated cells	4444	4444	4444	4444	3333	2322	1100	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	2220	1001	0000	0000
			Untreated cells	4444	4444	4444	4444	3333	2001	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	2322	1100	0000	0000	0000

18, rue Alain SAVARY - 25000 Besançon ▪ Tel: 03.81.25.09.04 ▪ Fax: 03.81.25.53.51 ▪ SARL au capital de 10 000 € ▪ RCS BESANÇON ▪ N° SIRET 51786053200012 ▪ N° TVA intra FR 23517860532 ▪ info@apexlabo.com

MIKROLAB GMBH
Laboratory for applied microbiology

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

TEST REPORT

06.05.2011

Test report A10ML1149-1Po

Evaluation of the effectiveness of

ALKACIDE

Test virus: poliovirus type 1

Method: according to NF T72-185; NF EN 14476+A1:2007-01-01under clean conditions

Sponsor:
ALKAPHARM
Parc Biocitech
102 avenue Gaston Roussel
F-93230 ROMAINVILLE
FRANCE

Norderoog 2, D-28259 Bremen
Tel.: +49 (0) 421-27819102, Fax: +49 (0) 421-2760283
MikroLab.GmbH@t-online.de, http://www.mikrolab-gmbh.de

1. Introduction

The objective of this study was to evaluate the virus-inactivating properties of the instrument disinfectant ALKACIDE against poliovirus type 1 using a quantitative suspension assay according to EN 14476:2007-02 (1) under clean conditions.

2. Test laboratory

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

3. Identification of the sample

Manufacturer	ALKAPHARM
Name of product	ALKACIDE (product code 20)
Batch number	2009.06.0270
Application	instrument disinfection
Expiry date	2012.06
Active compound (s) (100 g)	QAV glutaraldehyde
Appearance, odour	clear blue liquid; product specific
pH-values (in WSH)	undiluted: 6.28 (20°C) 0.5 %: 7.05 (20°C) 2.0 %: 7.12 (20°C) 5.0 %: 6.81 (20°C)
Storage conditions	room temperature in the dark (area with restricted access)
Date of arrival in the laboratory	01.12.2010

4. Materials

4.1 Culture medium and reagents

- Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM, Lonza Group Ltd., catalogue no. BE12-707F)
- 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)

4.2 Virus and cells

The poliovirus type 1 strain LSc-2ab (Chiron-Behring) was obtained from PD Dr. Olaf Thraenhart, Eurovir, D-14943 Luckenwalde. This virus (reference virus suspension) fulfilled the acquirements according to EN 5.3.2 and 5.3.3.

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

4.3 Apparatus, glassware and small items of equipment

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

5. Experimental conditions

Test temperature	20°C ± 1°C
Concentration of test product	5.0 %, 2.0 % and 0.5 % (non-active range) solutions
Contact times	5, 15 and 60 minutes
Interfering substances	clean conditions: 0.3 g/l bovine serum albumin (BSA)
Diluent	water of standardised hardness (WSH)
Procedure to stop action of product	immediate dilution
Test virus	poliovirus type 1 strain LSc-2ab (Chiron-Behring)
Period of analysis	14.03.2011 - 06.05.2011
End of testing	06.05.2011

6. Methods

6.1 Preparation of test virus suspension

For preparation of test virus suspension according to EN 6.3 poliovirus type 1 (stock virus suspension) was added to the monolayer for 1h at 37°C with gentle shaking every 15 min. After an incubation period of one day at 37°C, cells were objected to a threefold freeze/thawing process and after cellular debris was removed by low speed centrifugation the supernatant was stored after aliquotation at -80°C as test virus suspension.

6.2 Disinfectant

The disinfectant was diluted before the inactivation experiments with water of standardised hardness to 5.0 %, 2.0 % and 0.5 % solutions. For the disinfectant dilutions these concentrations were multiplied by a factor of 1.25 due to the addition of virus suspension and interfering substance.

6.3 Infectivity assay

Infectivity was determined as endpoint titration according to EN 6.5.1 transferring 0.1 ml of each dilution into eight wells of a microtitre plate, beginning with the highest dilution. This was followed by the addition of 0.1 ml of freshly trypsinized *BGM cells*. This cell suspension was adjusted to reach 10-15 x 10^3 cells per well. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5 % CO_2-atmosphere. The cytopathic effect was read by using an inverted microscope after seven days. Calculation of the infective dose $TCID_{50}$/ml was calculated with the method of Spearman (2) and Kärber (3) with the following formula:

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

meaning

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

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

n = number of determinations for each dilution step.

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_{10}-steps within the recommended exposure period.

6.5 Inactivation assay

Determination of virucidal activity followed EN 6.6. ALKACIDE was examined as 5.0 %, 2.0 % and 0.5 % (non-active range) solutions in water of standardised hardness at 20°C according to EN 5.2.2.2.
5, 15 and 60 minutes were chosen as contact times.

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^{-8}.

Titrations of the virus control were 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°C ± 1.0°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 µl hard water and 800 µl test product.

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 lowest apparently non-cytotoxic dilution of the product. This mixture or PBS as control was added to a volume of double concentrated cell suspension. After 1 h at 37°C the cells were centrifuged and re-suspended in cell culture medium (EN 6.6.4.2b).
Finally, a comparative titration of the test virus suspension was performed on the pretreated (disinfectant) and non pretreated (PBS) cells as described above.

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

As reference for test validation a 0.7 % formaldehyde solution according to EN 6.6.7.1 was included. 5, 15, 30 and 60 minutes were chosen as contact times. 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.

b) The cytotoxicity of the test product was two $\log_{10}$ steps (5.0 %) and one $\log_{10}$ step (2.0 %), respectively and allowed the detection of a four $\log_{10}$ reduction of virus titre.

c) The difference of the logarithmic titre of the virus control minus the logarithmic titre of the test virus in the reference inactivation test (see 6.6.7) was 1.50 after 30 min and 2.13 after 60 min for poliovirus.

d) The comparative titration on pretreated (disinfectant) and non pretreated (PBS) *BGM cells* showed no significant difference (<1 $\log_{10}$; EN 8.3) of virus titre: 8.25 (PBS) versus 8.00 (disinfectant 5.0 %) and 7.88 (disinfectant 2.0 %) $\log_{10}$ $TCID_{50}$/ml, respectively.

e) The control of efficacy for suppression of disinfectant activity (5.0 %) showed no decrease in virus titre.

Since all criteria following EN 8.3 were fulfilled, examination with poliovirus type 1 according to EN 14476:2007-02 is valid.

8. Results

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

ALKACIDE (5.0 %) was able to inactivate poliovirus type 1 after 5 minutes under clean conditions in a quantitative suspension test (Tables 1 and 2). The reduction factors were ≥ 4.38 and ≥ 4.25 (mean≥ 4.32) (inactivation ≥ 99.99 %).

The 2.0 % solution was also active after 5 minutes of exposure (Table 4). The RF achieved ≥ 5.25 (inactivation ≥ 99.999 %).

The 0.5 % solution did not show an activity after 60 minutes of exposure (Table 5).

9. Summary

The instrument disinfectant ALKACIDE of ALKAPHARM demonstrated effectiveness against poliovirus type 1 as 5.0 % solution and as 2.0 % solution after a contact time of 5 minutes under clean conditions.
Therefore, ALKACIDE can be declared as active against poliovirus type 1 as follows:

clean conditions 2.0 % 5 minutes

Bremen, 06.05.2011

- 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. Records 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 entirely, without the written approval of MikroLab GmbH 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.

Appendix:

Table 1: Raw data for ALKACIDE (5.0 %) tested against poliovirus type 1 under clean conditions (1st assay)

Table 2: Raw data for ALKACIDE (5.0 %) tested against poliovirus type 1 under clean conditions (2nd assay)

Table 3: Raw data for ALKACIDE (2.0 %) tested against poliovirus type 1 under clean conditions (1st assay)

Table 4: Raw data for ALKACIDE (2.0 %) tested against poliovirus type 1 under clean conditions (2nd assay)

Table 5: Raw data for ALKACIDE (0.5 %) tested against poliovirus type 1 under clean conditions

Table 6: Control of efficacy for suppression of disinfectant activity (5.0 %)

Table 7: Raw data (poliovirus) for cell sensitivity (5.0 %)

Table 8: Raw data (poliovirus) for cell sensitivity (2.0 %)

Table 9: Summary of results with ALKACIDE and poliovirus type 1

Table 1: Raw data for ALKACIDE (5.0 %) tested against poliovirus type 1 (quantal test; 8 wells) (2556) (1st assay)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	5.0%	clean conditions	5	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	5.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0030	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0044 0044	0003 0300	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4440 4044	0000 0004	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	3043 4444	3033 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0400 0404	0000 0000	0000 0000

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

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

Table 2: Raw data for ALKACIDE (5.0 %) tested against poliovirus type 1 (quantal test; 8 wells) (2572) (2nd assay)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	5.0%	clean conditions	5	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	5.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0030	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0044 0044	0003 0300	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4440 4044	0000 0004	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	3043 4444	3033 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4440 4040	0000 0000	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4000 4000	0000 0000	0000 0000

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

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

Table 3: Raw data for ALKACIDE (2.0 %) tested against poliovirus type 1 (quantal test; 8 wells) (2556) (1st assay)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	2.0%	clean conditions	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			15	tttt tttt	0400 0004	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
test product cytotoxicity	2.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0030	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0044 0044	0003 0300	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4440 4044	0000 0004	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	3043 4444	3033 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0400 0404	0000 0000	0000 0000

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

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

Table 4: Raw data for ALKACIDE (2.0 %) tested against poliovirus type 1 (quantal test; 8 wells) (2572) (2nd assay)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	2.0%	clean conditions	5	tttt tttt	4000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	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.
test product cytotoxicity	2.0%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0030	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0044 0044	0003 0300	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4440 4044	0000 0004	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	3043 4444	3033 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4440 4040	0000 0000	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4000 4000	0000 0000	0000 0000

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

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

Table 5: Raw data for ALKACIDE (0.5 %) tested against poliovirus type 1 (quantal test; 8 wells) (2556)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	0.5%	clean conditions	5	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 0444	0000 0040	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0004 0444	4000 0004	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
test product cytotoxicity	0.5%	clean conditions	n.a.	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0030	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0044 0044	0003 0300	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4440 4044	0000 0004	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	3043 4444	3033 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean conditions	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4440 4040	0000 0000	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4000 4000	0000 0000	0000 0000

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

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

Table 6: Control of efficacy for suppression of disinfectant activity (5.0 %) (2572)

Product	Interfering substance	dilutions (log_{10})								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
product	PBS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
product	clean conditions	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0043 0040	0000 0004	0000 0000	n.d.
product	dirty conditions	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

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

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

Table 7: Raw data (poliovirus) for cell sensitivity (5.0 %) (2572)

Product	Comparative virus titration with	Dilution	Dilutions (log_{10})								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
PBS	PBS	without	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PBS	clean conditions	without	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4303 0033	0000 0400	0000 0000
PBS	dirty conditions	without	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
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	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0040 0444	0000 0000	0000 0000

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

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

Table 8: Raw data (poliovirus) for cell sensitivity (2.0 %) (2572)

Product	Comparative virus titration with	Dilution	Dilutions (log_{10})								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
PBS	PBS	without	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PBS	clean conditions	without	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4303 0033	0000 0400	0000 0000
PBS	dirty conditions	without	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
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	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	2444 3244	0030 0303	0000 0000	0000 0000
		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

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

Table 9: Summary of results with ALKACIDE and poliovirus type 1

Product	Con-centration	Interfering substance	Level of cytotoxicity	log_{10} $TCID_{50}$/ml after ....min								≥ 4 log_{10} reduction after ... min
				0	0.5	5.0	10.0	15.0	30.0	60.0	120.0	
test product	5.0%	clean conditions	3.50	n.d.	n.d.	≤3.50	n.d.	≤3.50	n.d.	≤3.50	n.d.	5
test product	5.0%	clean conditions	3.50	n.d.	n.d.	≤3.50	n.d.	≤3.50	n.d.	n.d.	n.d.	5
test product	2.0%	clean conditions	2.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	≤2.75	n.d.	≤2.50	n.d.	15
test product	2.0%	clean conditions	2.50	n.d.	n.d.	≤2.75	n.d.	≤2.50	n.d.	n.d.	n.d.	5
test product	0.5%	clean conditions	2.50	n.d.	n.d.	7.50	n.d.	6.25	n.d.	4.50	n.d.	> 60
form-aldehyde	0.7% (m/V)	PBS	3.50	n.d.	n.d.	7.63	n.d.	7.25	6.38	5.75	n.d.	> 60
virus control	n.a.	clean conditions	n.a.	8.13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.88 7.75	n.d.	n.a.
suppression conrol	5.0%	clean conditions	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.00	n.d.	n.d.	n.a.
cell sens. PBS	n.a.	clean conditions	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8.25	n.d.	n.a.
cell sens. disinfectant	2% →1:100	clean conditions	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.88	n.d.	n.a.
cell sens. disinfectant	5% →1:1,000	clean conditions	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8.00	n.d.	n.a.

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

CHELAB SILLIKER
a Mérieux NutriSciences Company

LAB N° 0051

TEST REPORT N. 15/000275107

date of issue 31/07/2015

Customer ID 0073334

Messrs
ALKAPHARM
102, AVENUE GASTON ROUSSEL
93230 ROMAINVILLE
Francia

Sample information

Acceptance number 15.024579.0002

Delivered by The Courier on 17/06/2015

Receiving Date 17/06/2015

Place of origin ALKAPHARM 102, AVENUE GASTON ROUSSEL 93230 ROMAINVILLE Francia

Sample Description ALKACIDE F1400 2012.05.01 31/05/12

Sampling information

Sampled by Customer

ANALYTICAL RESULTS

	Value/Uncertain	Unit of measure	LoQ	LoD	Start/end date of analysis	Op. units	Line
ON SAMPLE AS IT IS							1
VIRUCIDAL ACTIVITY:SUSPENSION TEST Met.: UNI EN 14476:2013	view attached report				22/06/2015--28/07/2015	09	2

Operative units

Unit 09 : Via Fratta Resana PHARMA (TV)

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

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

Report digitally signed according to the law in force.
The results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This Test Report can not be copied, even partially, without Chelab's written permission.

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

EVALUATION OF VIRUCIDAL ACTIVITY ACCORDING TO UNI EN 14476:2013 QUANTITATIVE SUSPENSION TEST ON MURINE NOROVIRUS AND PRV

Documento con firma digitale avanzata ai sensi della normativa vigente.
I risultati contenuti nel presente Rapporto di prova si riferiscono esclusivamente al campione oggetto di analisi. Il presente Rapporto di prova non può essere riprodotto parzialmente, salvo autorizzazione scritta di Chelab srl..

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

Sponsor: ALKAPHARM
102, AVENUE GASTON ROUSSEL
93230 ROMAINVILLE
Francia

Contract Laboratory: CHELAB-SILLIKER SRL

Analysts: Dr. Francesca Squizzato
Dr. Giulio Zilio
Dr. Luna Ravasio

Analysis requested: Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity on murine norovirus and PRV according to UNI EN 14476:2013

Documento con firma digitale avanzata ai sensi della normativa vigente.
I risultati contenuti nel presente Rapporto di prova si riferiscono esclusivamente al campione oggetto di analisi. Il presente Rapporto di prova non può essere riprodotto parzialmente, salvo autorizzazione scritta di Chelab srl..

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

a) Sample Identification:
   - Product Name: ALKACIDE F1400 2012.05.01 31/05/12
   - Laboratory Number: 15.024579.0002
   - Storage conditions: Room temperature protected from light
   - Appearence: clear blueish liquid

b) Method used: UNI EN 14476:2013 evaluation of virucidal activity on murine norovirus and PRV. Neutralization by filtration.

c) Experimental Conditions:
   - Cell line:
     RAW 264.7 on murine norovirus
     BHK 21 on PRV
   - Test virus:
     Murine norovirus, strain S99 Berlin (2 passages from the original seed)
     PRV (HBV model virus) (6 passages from the original seed)
   - Product test concentrations: 5%, 2% and 0.5% (prepared in hard water)
   - Interfering substance: Albumin Bovine 0.3 g/L
   - Contact time: 15 minutes ± 10 seconds
   - Test temperature: 20°C ± 1°C
   - Method of filtration: ready to use MicroSpin™ S 400 HR columns (GE Healthcare)
   - Plates incubation temperature: 37°C ± 1°C, 5% CO_2 for 7 days (3 days for Murine norovirus)
   - Growth medium: MEM 10% FCS
   - Manteinance medium: MEM 2% FCS

d) Test Results: see tables n° 1-2.

Documento con firma digitale avanzata ai sensi della normativa vigente.
I risultati contenuti nel presente Rapporto di prova si riferiscono esclusivamente al campione oggetto di analisi. Il presente Rapporto di prova non può essere riprodotto parzialmente, salvo autorizzazione scritta di Chelab srl..

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

e) Conclusions:

According to UNI EN 14476:2013, the test product when used at concentration:

- 5%
- 2%

Has virucidal activity (R ≥ 4) under the following test conditions:

Contact time: 15 minutes ± 10 seconds

Temperature: 20°C ± 1°C

Interfering substance: Albumine Bovine 0.3 g/L

Test Viruses: Murine norovirus, strain S99 Berlin

PRV (HBV model virus)

Documento con firma digitale avanzata ai sensi della normativa vigente.
I risultati contenuti nel presente Rapporto di prova si riferiscono esclusivamente al campione oggetto di analisi. Il presente Rapporto di prova non può essere riprodotto parzialmente, salvo autorizzazione scritta di Chelab srl..

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

Table 1 – Results of the test UNI EN 14476:2013 on Murine norovirus

VIRUS	TEST	SAMPLE	VIRUS TITRATION $logTCID_{50}$	ACCEPTANCE CRITERIA	RESULT
NOROVIRUS	TITRATION OF VIRUS CONTROL	0 MINUTES	5.75	/	/
		15 MINUTES	5.75	/	/
	PRELIMINARY CYTOTOXICITY EFFECT	DONE			
	CELL SUSCEPTIBILITY	CONTROL	5.5	Control– sample < 1	R = 0 PASS
		0.00005% *	5.5		
	EFFICIENCY FOR SUP-PRESSION OF DISINFEC-TANT ACTIVITY	5%	5.375	≤ 0.5	R = 0.375 PASS
		2%	5.25	≤ 0.5	R = 0.5 PASS
		0.5%	5.5	≤ 0.5	R = 0.25 PASS
	VIRUCIDAL ACTIVITY	5%	<1.5	R ≥ 4	R = ≥4.25 ACTIVE
		2%	<1.5	R ≥ 4	R = ≥4.25 ACTIVE
		0.5%	2.625	R ≥ 4	R = 3.125 NOT ACTIVE
	REFERENCE VIRUS INACTIVATION TEST	30 MINUTES	2.75	N.A.	R = 3
		60 MINUTES	2	N.A.	R = 3.75

* lowest apparently non cytotoxic dilution
N.A. = not available in UNI EN 14476:2013

Documento con firma digitale avanzata ai sensi della normativa vigente.
I risultati contenuti nel presente Rapporto di prova si riferiscono esclusivamente al campione oggetto di analisi. Il presente Rapporto di prova non può essere riprodotto parzialmente, salvo autorizzazione scritta di Chelab srl..

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

Table 2 – Results of the test UNI EN 14476:2013 on PRV

VIRUS	TEST	SAMPLE	VIRUS TITRATION $logTCID_{50}$	ACCEPTANCE CRITERIA	RESULT
PRV	TITRATION OF VIRUS CONTROL	0 MINUTES	5.75	/	/
		15 MINUTES	5.75	/	/
	PRELIMINARY CYTOTOXICITY EFFECT	DONE			
	CELL SUSCEPTIBILITY	CONTROL	5.875	Control– sample < 1	R = 0.25 PASS
		0.002 *	6.125		
	EFFICIENCY FOR SUP-PRESSION OF DISINFEC-TANT ACTIVITY	5%	5.875	≤ 0.5	R = 0.125 PASS
		2%	5.75	≤ 0.5	R = 0 PASS
		0.5%	6.0	≤ 0.5	R = 0.25 PASS
	VIRUCIDAL ACTIVITY	5%	<1.5	R ≥ 4	R = ≥4.25 ACTIVE
		2%	<1.5	R ≥ 4	R = ≥4.25 ACTIVE
		0.5%	2.625	R ≥ 4	R = 3.125 NOT ACTIVE
	REFERENCE VIRUS INACTIVATION TEST	30 MINUTES	3.25	N.A.	R = 2.5
		60 MINUTES	2.5	N.A.	R = 3.25

* lowest apparently non cytotoxic dilution
N.A. = not available in UNI EN 14476:2013

Documento con firma digitale avanzata ai sensi della normativa vigente.
I risultati contenuti nel presente Rapporto di prova si riferiscono esclusivamente al campione oggetto di analisi. Il presente Rapporto di prova non può essere riprodotto parzialmente, salvo autorizzazione scritta di Chelab srl..

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

MIKROLAB GMBH
Laboratory for applied microbiology

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

TEST REPORT

20.01.2011

Test report no. A10ML1149-1H

Evaluation of the effectiveness of

ALKACIDE

Test virus: Herpes Simplex Virus type 1

Method: following NF T72-185; NF EN 14476+A1:2007-01-01 under clean conditions

Sponsor:

ALKAPHARM
Parc Biocitech
102 avenue Gaston Roussel
F-93230 ROMAINVILLE
FRANCE

Norderoog 2, D-28259 Bremen
Tel.: +49 (0) 421-27819102, Fax: +49 (0) 421-2760283
MikroLab.GmbH@t-online.de, http://www.mikrolab-gmbh.de

1. Introduction

The objective of this study was to evaluate the virus-inactivating properties of instrument disinfectant ALKACIDE against Herpes Simplex Virus (HSV) type 1 using a quantitative suspension assay following EN 14476:2007-02 (1) under clean conditions.

2. Test laboratory

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

3. Identification of the test sample

Manufacturer	ALKAPHARM
Name of product	ALKACIDE (product code 20)
Application	instrument disinfectant
Batch number	2009.06.02.70
Expiry date	2012.06
Active compound (s)	glutaraldehyde didecyldimethylammonium chloride
Appearance and odour	clear, blue liquid; product specific
pH-value (s) in WSH	undiluted: 6.33 (20°C) 0.5 %: 7.05 (20°C) 2.0 %: 7.11 (20°C)
Storage conditions	room temperature in the dark (area with restricted access)
Date of arrival in the laboratory	01.12.2010

4. Materials

4.1 Culture medium and reagents

- Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM, Lonza Group Ltd., catalogue no. BE12-707F)
- 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)

4.2 Virus and cells

Herpes Simplex Virus type 1 prototype strain Kupka originated from the Department of virology and antiviral therapy, Universitätsklinikum Jena, D-07740 Jena. Before inactivation assays, virus had been passaged in *Rabbit Primary Kidney Cells (RTP)* and 3-5 times in *BGM cells*.

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

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_2 incubator (Nunc GmbH & Co. KG, model QWJ 350)
- Agitator (Vortex Genie Mixer, type G 560E)
- pH measurement 315i (WTW, article no. 2A10-100)
- Centrifuge (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, type 113)
- Microscope (Olympus, type CK 30)
- Water bath (JULABO, Julabo U 3)
- Adjustable volume automatic pipettes (Eppendorf AG)
- Polysterol 96-well microtiter plates (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Germany)
- Cell culture flasks (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Germany)
- Sealed test tubes (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany)

5. Experimental conditions

Test temperature	20°C ± 1.0°C
Concentration of test product	0.5 %, 2.0 % and 0.05 (non-active range)
Contact times	1, 5, 15 and 60 minutes
Interfering substances	clean conditions: 0.3 g/l bovine serum albumin (BSA)
Stability of product in the mix with virus and interfering substance (0.5 %)	no flocculations
Diluent	water of standardised hardness
Procedure to stop action of product	immediate dilution
Test virus strain	Herpes Simplex Virus type 1 prototype strain Kupka
Test period	01.12.2010 – 20.01.2011
End of testing	20.01.2011

6. Methods

6.1 Preparation of test virus suspension

For preparation of test virus suspension, *BGM cells* were cultivated with Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium and 10 % or 2 % fetal calf serum.

BGM cells were infected with a multiplicity of infection of 0.1. After cells showed a cytopathic effect, they were subjected to a onefold freeze/thaw procedure followed by a low speed centrifugation (10 min and 1000 x g) in order to sediment cell debris. After aliquotation, test virus suspension was stored at – 80°C.

6.2 Disinfectant

The test product was examined as 0.5 %, 2.0 % and 0.05 % (demonstration of non-active range) solutions. These solutions were prepared with water of standardised hardness immediately before the inactivation tests. For the disinfectant dilutions these concentrations were multiplied by a factor of 1.25 due to the addition of test virus suspension and interfering substance.

6.3 Infectivity assay

Infectivity was determined as endpoint titration according to EN 6.5.1 transferring 0.1 ml of each dilution into eight wells of a microtitre plate, beginning with the highest dilution. This was followed by the addition of 0.1 ml of freshly trypsinized *BGM cells*. This cell suspension was adjusted to reach 10-15 x 10^3 cells per well. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5 % CO_2-atmosphere. The cytopathic effect was read by using an inverted microscope after seven days. Calculation of the infective dose $TCID_{50}$/ml was calculated with the method of Spearman (2) and Kärber (3) with the following formula:

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

meaning

X_0 = $\log_{10}$ of the lowest dilution with 100 % positive reaction
r = number of pos. determinations of lowest dilution step with 100 % positive and all higher positive dilution steps
n = number of determinations for each dilution step.

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 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 $\log_{10}$-steps within the recommended exposure period.

6.5 Inactivation assay

Investigations for determination of virucidal activity followed the EN 14776. The disinfectant ALKACIDE was examined as 0.05 %, 0.5 % and 2.0 % solutions according to EN 5.2.2.2.
1, 5, 15 and 60 minutes were chosen as exposure times.
Due to a more convenient handling, the volumes in this assay were 0.1 ml test virus suspension, 0.1 ml interfering substance (clean conditions) 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^{-8}.

A control of efficiency for suppression of disinfectant activity was included (EN 6.6.6).

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

6.6 Determination of cytotoxicity

Determination of cytotoxicity was performed according to EN 6.6.4.1 with 200 µl hard water and 800 µl test product.

Values are given as $log_{10}CD_{50}$/ml (in analogy to $log_{10}TCID_{50}$/ml).

6.7 Cell sensitivity to virus

For the control of cell sensitivity to virus the lowest apparently non-cytotoxic dilution of the product (or PBS as control) was added to a volume of double concentrated cell suspension. After 1 h at 37°C the cells were centrifuged and re-suspended in cell culture medium (EN 6.6.4.2b).

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

6.8 Control of efficacy for suppression of disinfectant activity

A control of efficiency for suppression of disinfectant activity (EN 6.6.6) was included.

6.9 Reference virus inactivation test

As reference for test validation 0.7 % formaldehyde according to EN 6.6.7.1 was included. Contact times were 5, 15, 30 und 60 min. In addition, cytotoxicity of formaldehyde test solution was determined following EN 6.6.7.2 with dilutions up to 10^{-5}.

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

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

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 (0.5 %).

b) The cytotoxicity of the test product (0.5 % and 2.0 %) was one log_{10} step.

c) The comparative titration on pretreated (disinfectant) and non pretreated (PBS) *BGM cells* showed an acceptable difference (<1 log_{10}; EN 6.6.4.2) of virus titres: 6.63 (PBS) versus 6.38 log_{10} $TCID_{50}$/ml (0.5 % solution).

d) The control of efficacy for suppression of disinfectant activity demonstrated no significant decrease in virus titre.

Since all criteria following EN 8.3 were fulfilled, examinations with HSV type 1 following EN 14476 is valid.

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.

The test product (0.5 %) was able to inactivate HSV type 1 after one minute exposure time under clean conditions in this quantitative suspension test. The reduction factors were ≥ 4.62 and ≥ 4.50 (mean ≥ 4.56). This corresponded to an inactivation of ≥ 99.99 %. The 2.0 % solution was additionally active within one minute (clean conditions).

The 0.05 % solution (chosen for the demonstration of the non-active range) showed no sufficient activity against the HSV type 1 after five minutes of exposure time.

9. Summary

In summary, a sufficient reduction of virus titre could be achieved by the instrument disinfectant ALKACIDE as 0.5 % solution after an exposure time of one minute. 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 instrument disinfectant ALKACIDE for inactivation of herpes simplex virus type 1 as follows:

clean conditions 0.5 % 1 min

Bremen, 20.01.2011

- Dr. Jochen Steinmann -

9. Quality control

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

1) Chemicals Act of Germany, Appendix 1, dating of 01.08 1994 (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.

10. Records 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 entirely, without the written approval of MikroLab GmbH 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.

11. 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 Pharmak; 162, 1931, 480-487

Appendix

Table 1: Raw data of ALKACIDE (0.5 %) tested against HSV type 1 (clean conditions) (1st assay)

Table 2: Raw data of ALKACIDE (0.5 %) tested against HSV type 1 (clean conditions) (2nd assay)

Table 3: Raw data of ALKACIDE (2.0 %) tested against HSV type 1 (clean conditions)

Table 4: Raw data of ALKACIDE (0.05 %) tested against HSV type 1 (clean conditions)

Table 4: Raw data for the control of efficacy for suppression of disinfectant activity (0.5 %)

Table 5: Raw data (HSV type 1) for cell sensitivity (0.5 %)

Table 6: Summary of results with ALKACIDE and HSV type 1

Table 1: Raw data of ALKACIDE (0.5 %) tested against HSV type 1 (quantal test; 8 wells) (2450)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
Test product	0.5%	clean	1	tttt tttt	0000 0100	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			5	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product cytotoxicity	0.5%	clean	n.a.	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	3232 3434	2122 2001	2000 3000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	0120 2001	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Virus control	n.a.	clean	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4040 0430	0020 0004	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 2 : Raw data of ALKACIDE (0.5 %) tested against HSV type 1 (quantal test; 8 wells) (2474)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
Test product	0.5%	clean	1	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			5	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
Test product cytotoxicity	0.5%	clean	n.a.	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	3232 3434	2122 2001	2000 3000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	0120 2001	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Virus control	n.a.	clean	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0104	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4344	0340 4300	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 3: Raw data of ALKACIDE (2.0 %) tested against HSV type 1 (quantal test; 8 wells) (2474)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
Test product	2.0%	clean	1	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			5	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product cytotoxicity	2.0%	clean	n.a.	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	3232 3434	2122 2001	2000 3000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	0120 2001	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Virus control	n.a.	clean	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0104	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4344	0340 4300	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 ALKACIDE (0.05 %) tested against HSV type 1 (quantal test; 8 wells) (2474)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
Test product	0.05%	clean	1	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4443 4444	0000 0304	0000 0000	0000 0000	n.d.
			5	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	3400 0004	0000 4000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product cytotoxicity	0.05%	clean	n.a.	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	3232 3434	2122 2001	2000 3000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	0120 2001	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Virus control	n.a.	clean	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4040 0430	0020 0004	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: Control of efficacy for suppression of disinfectant activity (0.5 %) (2474)

Product	Interfering substance	Dilutions (log_{10})								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Test product	PBS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product	clean	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4434 4444	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
Test product	dirty	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

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

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

Table 6: Raw data (HSV type 1) for cell sensitivity (0.5 %) (2474)

Product	Comparative virus titration with	Product 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.
PBS	clean	-	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4304 4444	0044 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
PBS	dirty	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product	PBS	1:100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product	clean	1:100	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0443 4444	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
Test product	dirty	1:100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

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

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

Table 7: Summary of results with ALKACIDE and HSV type 1

Product	Con-centration	Interfering substance	Level of cytotoxicity	log_{10} $TCID_{50}$/ml after ....min									> 4 log_{10} reduction after ... min
				0	0.25	0.5	1.0	2.0	5.0	15.0	30.0	60.0	
Product	0.5%	clean	2.50	n.d.	n.d.	n.d.	≤ 2.63	n.d.	≤ 2.50	n.d.	n.d.	n.d.	1.0
Product	0.5%	clean	2.50	n.d.	n.d.	n.d.	≤ 2.50	n.d.	≤ 2.50	n.d.	n.d.	≤ 2.50	1.0
Product	2.0%	clean	2.50	n.d.	n.d.	n.d.	≤ 2.50	n.d.	≤ 2.50	≤ 2.50	n.d.	n.d.	1.0
Product	0.05%	clean	1.50	n.d.	n.d.	n.d.	6.75	n.d.	6.00	n.d.	n.d.	n.d.	> 5.0
Form-aldehyde	0.7% (m/V)	PBS	3.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.50	≤4.00	≤3.50	≤ 3.50	≥ 30 min
Virus control	n.a.	clean	n.a.	6.75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.25 7.00	n.a.
Suppression control	0.5%	clean	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.50	n.d.	n.a.
Sens. control with PBS	n.a.	n.a.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.63	n.a.
Sens. control Product	n.a.	n.a.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.38	n.a.

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

MIKROLAB GMBH
Laboratory for applied microbiology

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

TEST REPORT

30.01.2011

Test report no. A10ML1149-1R

Evaluation of the effectiveness of

ALKACIDE

Test virus: human rotavirus strain Wa

Method: following NF T72-185; NF EN 14476+A1:2007-01-01 under clean conditions

Sponsor:
ALKAPHARM
Parc Biocitech
102 avenue Gaston Roussel
F-93230 ROMAINVILLE
FRANCE

Norderoog 2, D-28259 Bremen
Tel.: +49 (0) 421-27819102, Fax: +49 (0) 421-2760283
MikroLab.GmbH@t-online.de, http://www.mikrolab-gmbh.de

1. Introduction

The objective of this study was to evaluate the virus-inactivating properties of the instrument disinfectant ALKACIDE against human rotavirus strain Wa using a quantitative suspension assay following EN 14476:2007-02 (1) under clean conditions.

2. Test laboratory

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

3. Identification of the sample

Manufacturer	ALKAPHARM
Name of product	ALKACIDE (product code 20)
Application	instrument disinfectant
Batch number	2009.06.02.70
Expiry date	2012.06
Active compound (s)	glutaraldehyde didecyldimethylammonium chloride
Appearance and odour	clear, blue liquid; product specific
pH-value (s) in WSH	undiluted: 6.33 (20°C) 0.5 %: 7.05 (20°C)
Storage conditions	room temperature in the dark (area with restricted access)
Date of arrival in the laboratory	01.12.2010

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)
- BSA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, article no. CA-2153)
- 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_2 incubator, Nunc GmbH & Co. KG, model QWJ 350
- Agitator (Vortex Genie Mixer, type G 560E)
- pH measurement 315i (WTW, article no. 2A10-100)
- Centrifuge (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, type 113)
- Microscope (Olympus, type CK 30)
- Water bath (JULABO, Julabo U 3)
- Adjustable volume automatic pipettes (Eppendorf AG)
- Polysterol 96-well microtiter plates (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Germany)
- Cell culture flasks (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Germany)
- Sealed test tubes (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany)

5. Experimental conditions

Test temperature	20°C ± 1.0°C
Concentration(s) of test product	0.05 % (non-active range) and 0.5 % solutions
Contact time(s)	1, 5 and 15 minutes
Interfering substance(s)	0.03 % BSA (clean conditions)
Diluent	water of standardised hardness
Procedure to stop action of product	immediate dilution and gel filtration
Test virus	human rotavirus strain Wa
Period of analysis	01.12.2010 – 30.01.2011
End of testing	30.01.2011

6. Methods

6.1 Preparation of test virus suspension

After three washings with serum-free Eagle`s Minimum Essential Medium cells were incubated with EMEM without fetal calf serum 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 $TCID_{50}$/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 Disinfectant

The test product was evaluated as 0.05 % (demonstration of non-active range) and 0.5 % solutions. These solutions were prepared with water of standardised hardness (WSH) immediately before the inactivation tests.

6.3 Infectivity assay

Infectivity was determined by means of end point dilution titration in a micro-procedure. For this, samples were serially diluted with ice-cold EMEM with 5 µg/ml trypsin and 100 µl of each dilution were placed after aspiration of the medium in eight wells of a sterile polystyrene flat bottom 96-well microtiter plate with a preformed *MA-104* monolayer. After one hour at

37°C, 100 µl EMEM with 5 µg/ml trypsin were added. Incubation took place at 37°C in a CO_2-atmosphere (5.0 % CO_2 - content). Finally, cultures were observed for cytopathic effects for six 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.

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 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 $\log_{10}$-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 as 0.05 % and 0.5 % solutions in hard water according to EN 5.2.2.2.
1, 5 and 15 minutes were chosen as contact times.

Since the cytotoxicity did not allow following the reduction of residual infectivity titre over the range of four $\log_{10}$ steps, ready to use MicroSpin™ S-400 HR columns (GE Healthcare, D-79021 Freiburg, Germany) were used in order to remove the cytotoxic agents according to instructions of the manufacturer with addition of a 0.5 % BSA solution before loading. Virus controls without columns were included.

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, 0.1 ml interfering substance (clean conditions) and 0.8 ml test product.

Virus controls were incorporated after 0 min and 60 min exposure time. One part by volume of test virus suspension was mixed with one part by volume PBS and eight parts by volume of hard water.

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

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

6.6 Determination of cytotoxicity

For determination of cytotoxicity of the disinfectant, two parts by volume of hard water were mixed with eight 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).

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 lowest apparently non-cytotoxic dilution of the product. This mixture or PBS as control was added to a volume of double concentrated cell suspension. After 1 h at 37°C the cells were centrifuged and re-suspended in cell culture medium (EN 6.6.4.2b).
Finally, a comparative titration of the test virus suspension was performed on the pretreated (disinfectant) and non pretreated (PBS) cells as described above.

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

As reference for test validation 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.

7. Verification of the methodology

The following criteria as mentioned in EN 8.3 were fulfilled:

a) The titre of the test virus suspensions allowed the determination of 4 $\log_{10}$ reduction (with and without columns).

b) There was no cytotoxicity of the test product (0.5 %) in the 1:10-dilutions after treatment with the columns thus allowing the detection of a four $\log_{10}$ reduction of virus titre.

c) The comparative titration on pretreated (0.75 % solution of the disinfectant) and non pretreated (PBS) *MA-104 cells* showed no significant difference (<1 $\log_{10}$; EN 8.3) of virus titre: 6.38 (PBS) versus 6.25 (disinfectant) $\log_{10}$ $TCID_{50}$/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 valid.

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.

ALKACIDE (0.5 % solution) was able to inactivate human rotavirus after one minute in this quantitative suspension test. At this time point, no human rotavirus was detectable. The reduction factors were ≥ 4.25 (without columns) and ≥ 5.13 (with columns) (mean ≥ 4.69) (Table 7).

The 0.05 % solution was not able to inactivate rotavirus after 5 minutes of exposure time (Table 3).

9. Summary

The instrument disinfectant ALKACIDE of ALKAPHARM demonstrated effectiveness as 0.5 % solution against human rotavirus after a contact time of one minute. Therefore, ALKACIDE can be declared as active against human rotavirus strain Wa under clean conditions as follows:

clean conditions 0.5 % 1 minute

Bremen, 30.01.2010

- 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. Records 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 entirely, without the written approval of MikroLab GmbH 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 Pharmak; 162, 1931, 480-487

Appendix:

Table 1: Raw data for ALKACIDE (0.5 %) tested against rotavirus without columns (clean conditions) (1st assay)

Table 2: Raw data for ALKACIDE (0.05 %) tested against rotavirus with columns (clean conditions) (non-active range)

Table 3: Raw data for ALKACIDE (0.5 %) tested against rotavirus without columns (clean conditions) (2nd assay)

Table 4: Raw data for ALKACIDE (0.5 %) tested against rotavirus with columns (clean conditions) (3rd assay)

Table 5: Raw data for the control of efficacy for suppression of disinfectant activity

Table 6: Raw data (rotavirus) for cell sensitivity

Table 7: Summary of results with ALKACIDE and rotavirus

Table 1(1st assay): Raw data for ALKACIDE (0.5 %) tested against rotavirus (quantal test; 8 wells) (2467)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	0.5%	clean	1	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			5	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	0.5%	clean	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	3233 3332	2122 3022	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	2232 3233	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	0122 3232	0002 0100	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	3333 3333	0100 2222	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	3233 3333	2210 2202	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 2: Raw data for ALKACIDE (0.05 %) tested against rotavirus (quantal test; 8 wells) (2467)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	0.05%	clean	1	4444 4444	4444 4444	4444 4444	3333 3333	2223 1310	0300 0030	0000 0000	0000 0000	n.d.
			5	4444 4444	4444 4444	4444 4444	3333 3322	0323 2222	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	0.05%	clean	n.a.	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	3233 3332	2122 3022	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	2232 3233	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	0122 3232	0002 0100	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	3333 3333	0100 2222	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	3233 3333	2210 2202	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 3 (2nd assay): Raw data for ALKACIDE (0.5 %) tested against rotavirus (quantal test; 8 wells) (2483)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	0.5%	clean	1	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			5	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	0.5%	clean	n.a.	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	3233 3332	2122 3022	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	2232 3233	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	0122 3232	0002 0100	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
virus control	n.a.	clean	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	2343 3333	1222 2223	0030 0003	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 (3rd assay): Raw data for ALKACIDE (0.5 %) tested against rotavirus with columns (quantal test; 8 wells) (2483)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	0.5%	clean	1	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			5	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product cytotoxicity	0.5%	clean	n.a.	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	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.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	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.
virus control	n.a.	clean	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	3343 3443	2333 3332	3000 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: Control of efficacy for suppression of disinfectant activity (2467)

Product	Interfering substance	Dilutions (log_{10})								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
product	PBS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
product	clean conditions	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	3232 2303	0000 0002	0000 0200	0000 0000	0000 0000
product	dirty conditions	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

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

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

Table 6: Raw data (human rotavirus) for cell sensitivity (0.5 %) (without columns) (2467)

Product	Comparative virus titration with	Dilution	Dilutions (log_{10})								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
PBS	PBS	without	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PBS	clean conditions	without	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0203 2222	0000 0020	0000 0000	0000 0000	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	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
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	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	2011 2220	0000 0000	0000 0000	0000 0000	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

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: Summary of results with ALKACIDE and human rotavirus

Product	Con-centration	Interfering substance	Level of cytotoxicity	log_{10} $TCID_{50}$/ml after ....min								≥ 4 log_{10} reduction after ... min
				0	0.25	0.5	1.0	5.0	15.0	30.0	60.0	
test product	0.5%	clean	2.50	n.d.	n.d.	n.d.	≤2.50	≤2.50	n.d.	n.d.	n.d.	≥ 1
test product	0.5%	clean	2.50	n.d.	n.d.	n.d.	≤2.50	≤2.50	≤2.50	n.d.	n.d.	1
test product (col)	0.5%	clean	1.50	n.d.	n.d.	n.d.	≤1.50	≤1.50	≤1.50	n.d.	n.d.	1
test product	0.05%	clean	1.50	n.d.	n.d.	n.d.	6.63	6.38	n.d.	n.d.	n.d.	> 5
form-aldehyde	0.7% (m/V)	PBS	3.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.38	5.50	4.63	≤3.50	≥ 60
virus control	n.a.	clean	n.a.	6.13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.25 6.75	n.a.
virus control (col)	n.a.	clean	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.63	n.a.
control suppression	n.a.	clean	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.63	n.d.	n.a.
cell sens. (PBS)	n.a.	clean	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.38	n.a.
cell sens. (disinfectant)	1:100	clean	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.25	n.a.

n.a. = not applicable n.d. = not done (col) = columns

TEST REPORT

VIRUCIDAL ACTIVITY OF THE ALKACIDE PRODUCT AGAINST THE HEPATITIS C VIRUS (BVDV MODEL)

For : **ALKAPHARM**
PARC BIOCITECH
102 AVENUE G. ROUSSEL
93230 ROMAINVILLE

Date of request: 03/12/2014
Study number: n°041V03-2014-02

VIRUCIDAL TESTS:

According to the NF EN 14476 (September 2013) standard – chemical antiseptics and disinfectants – virucidal quantitative suspension tests for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine.

Tests using the ALKACIDE product, batch # 2011.07.01.61, on the Hepatitis C virus (viral model: Bovine Viral Diarrhea Virus BVDV).

This test report included 13 pages.

Study completion date: 06/20/2014

Stephanie MOROT-BIZOT
PhD in microbiology
Study director

Professeur Georges HERBEIN
Professor of Medicine – MD-PhD in virology
Scientific consultant

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 Besançon
Tél : 03 81 25 09 04 Fax : 03 81 25 53 51
info@apexbiosolutions.com
N° SIRET 517 860 532 00012 – RCS Besançon
N° TVA intra FR 23517860532
SARL au capital de 10 060 €

SUMMARY

1. PERFORMING LABORATORY
2. PRODUCT IDENTITY
3. EXPERIMENTAL CONDITIONS
4. VALIDATION
5. VIRUCIDAL ASSAYS
6. VALIDATION OF THE METHODOLOGY
7. CONCLUSIONS
8. TECHNICAL APPENDIX

18, rue Alain SAVARY - 25000 Besançon ▪ Tel: 03.81.25.09.04 ▪ Fax: 03.81.25.53.51▪ SARL au capital de 20 000 € ▪ RCS BESANÇON ▪ N° SIRET 51786053200012 ▪ N° TVA intra FR 23517860532 ▪ info@apexlabo.com

1 PERFORMING LABORATORY

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 BESANÇON
FRANCE

2 PRODUCT IDENTITY

ALKACIDE

Batch # 2011.07.01.61

Expiration date: 07/01/2014

Manufacturer: ALKAPHARM

Manufacturing date: non communicated

Storage conditions: as recommended by the manufacturer

Active substances : glutaraldehyde

Appearance of the product: blue

Product diluent recommended by the manufacturer for use: tap water

Date of delivery of the product: 04/10/2014

Date of tests: from 04/14/2014 to 05/05/2014

3 EXPERIMENTAL CONDITIONS

Temperature used during the assays: 20°C ± 1°C

Titration units: log $TCID_{50}$

Exposure time: 15 minutes

Diluent used for the product: hard water

Test concentrations: 2,0% - 1,0% - 0,2%

Viral strain: BVDV ATCC ref. VR-534, batch n°10W, grown on VERO cells, at 37°C, under 5% CO2 atmosphere

Organic soil load: 3 g/l bovine serum albumin

Product stability: good

Stop solution: cold shock

Viral titer:

Viral titers are expressed in log $TCID_{50}$ per ml, according to the SPEARMAN-KÄRBER method. Titer of BVDV suspension assay = 7,25 log $TCID_{50}$.

4 VALIDATION

a) Methodology

The VERO cells were exposed to the product ALKACIDE and a weak cytotoxic effect was observed at the dilution 10^{-2}.

b) Sensibility assays

The BVDV was titrated on cell cultures untreated with the ALKACIDE product (indicator cell line), and titrated on cell cultures treated with ALKACIDE product.

	Viral titer (log $TCID_{50}$)		
Product dilution	Untreated cell cultures	Treated cell cultures	**Viral titer (log $TCID_{50}$)**
ALKACIDE 10^{-3}	7,000	6,125	**0,875**

According to the European standard EN 14476, the ALKACIDE product used at the dilution of 10^{-3} does not have an effect on the BVDV titration method (the difference between viral titers must be < 1,0 log).

c) Validations of the cold shock method:

Product Concentration	**Organic soil load**	**Viral titer (log $TCID_{50}$)**	**Difference with the viral suspension**
ALKACIDE 2,0%	3 g/l BSA	Trial 1 : 7,000	0,250
		Trial 2 : 7,000	0,250

The difference between viral titer and viral suspension must be $\leq 0,5$ log.

c) Inactivation assays of the virus with a control solution

	Viral titer (log $TCID_{50}$)	**Viral titer reduction (log $TCID_{50}$)**
Viral suspension control	6,875	
formaldehyde 1,4%		
inactivation 5 min	6,625	0,250
inactivation 15 min	6,375	0,500
inactivation 30 min	5,875	**1,000**

The viral titer reduction (difference between the titers of the viral suspension treated with 1,4 % formaldehyde and the viral suspension control) must be between -0,5 and -2,5 log after 30 min of exposure. In the assays, the viral titer reduction is 1,0 log, indicated that the BVDV is inactivated after 30 min of exposure with the 1,4 % formaldehyde solution.

5 VIRUCIDAL ASSAYS

Trial 1

The viral suspension was titrated at **7,000 log $TCID_{50}$** prior the assays.

PRODUCT	Concentration (v/v)	Time of exposure	Temperature	**Viral titer (log $TCID_{50}$)**	**Viral titer reduction**
ALKACIDE	**2,0 %**	15 min	20°C	2,750	**4,250**

The concentrations of the product demonstrated a virucidal activity on the virus tested if the viral titer reduction is ≥ 4,0 log.

Trial 2

The viral suspension was titrated at **7,000 log $TCID_{50}$** prior the assays

PRODUCT	Concentration (v/v)	Time of exposure	Temperature	**Viral titer (log $TCID_{50}$)**	**Viral titer reduction**
ALKACIDE	**2,0 %**	15 min	20°C	2,875	**4,125**

The concentrations of the product demonstrated a virucidal activity on the virus tested if the viral titer reduction is ≥ 4,0 log.

6 VALIDATION OF THE METHODOLOGY

The assays were validated as required by the European standard EN 14476:

- The viral titers of the suspension tests were sufficient in order to observe a reduction of 4 log after time exposure with the product. The viral titer of the BVDV was 7,25 log TCID50.
- The virus was inactivated with the control solution of 1,4 % formaldehyde after 30 min of exposure : the reduction observed was of 1,00 log for the BVDV.
- The ALKACIDE product does not have a cytotoxic effect on the VERO cells.
- The organic soil load (3 g/l BSA) does not affect the infectious capacity of the BVDV.
- The ALKACIDE product does not affect the infectious capacity of the virus: the differences in viral titers between the virus inoculated on VERO cells and the virus inoculated on the VERO cells treated with the ALKACIDE product was ≤ 1,0 log (0,875 log).
- The difference of viral titers and viral titers in the cold shock method is ≤ 0,5 log

18, rue Alain SAVARY - 25000 Besançon ▪ Tel: 03.81.25.09.04 ▪ Fax: 03.81.25.53.51▪ SARL au capital de 20 000 € ▪ RCS BESANÇON ▪ N° SIRET 51786053200012 ▪ N° TVA intra FR 23517860532 ▪ info@apexlabo.com

7 CONCLUSION

The assays performed with the ALKACIDE batch n° 2011.07.01.61 product demonstrated that:

- The **ALKACIDE product demonstrated a virucidal activity on the Hepatitis C Virus (BVDV model) from the concentration 2,0%,** as required by the European standard EN 14476, following a **15 minutes** exposure period, at 20°C, in clean conditions.

18, rue Alain SAVARY - 25000 Besançon ▪ Tel: 03.81.25.09.04 ▪ Fax: 03.81.25.53.51▪ SARL au capital de 20 000 € ▪ RCS BESANÇON ▪ N° SIRET 51786053200012 ▪ N° TVA intra FR 23517860532 ▪ info@apexlabo.com

TECHNICAL APPENDIX 1

Cell line: VERO cells, R & D Biotech, ref. 84009, batch n° 110118-110V
Viral strain: **Bovine Viral Diarrhea Virus,** ATCC ref. VR-534, batch n°10W

Buffer and reagents:

- PBS buffer: sodium chloride, Dominique DUTSCHER, ref. 19032391, batch n° 836751; sodium phosphate dibasic, Sigma Aldrich, ref. S5136, batch n° BCBC7067V; sodium phosphate monobasic, Sigma Aldrich, ref. S5011, batch n° 1019K01021V
- DMEM media, PAN Biotech, ref. P04-03590, batch n° 8870813
- Fœtal calf sera, Sigma Aldrich, F7524, batch n°062M3396

Reagents:

- Bovine albumin serum (powder), Sigma Aldrich, ref. 05479, batch n° STBB7838V

Inactivation solution:

- Formaldehyde, Sigma Aldrich, ref. F-1635, batch n° BCBB3510

TECHNICAL APPENDIX 2

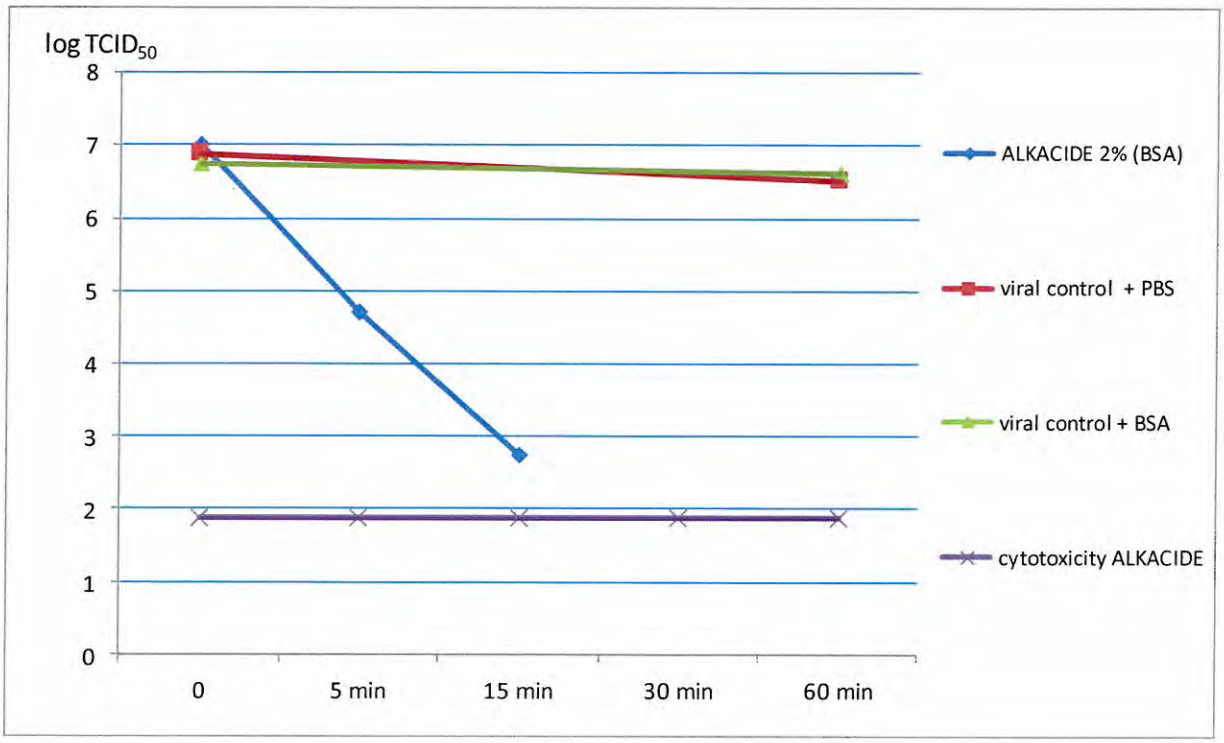
Table A1 - Titration of BVDV virus by cytopathic effect, with the Spaerman-Kärber method:

log $TCID_{50}$ = 7,25

Dilution (- log)	Results	% positive results
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	33344444	100
-6	33333333	100
-7	10011111	75
-8	00000000	0
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Sum of positives cultures %		475

Figure 1 – Chart of the results :

Trial 1



Trial 2

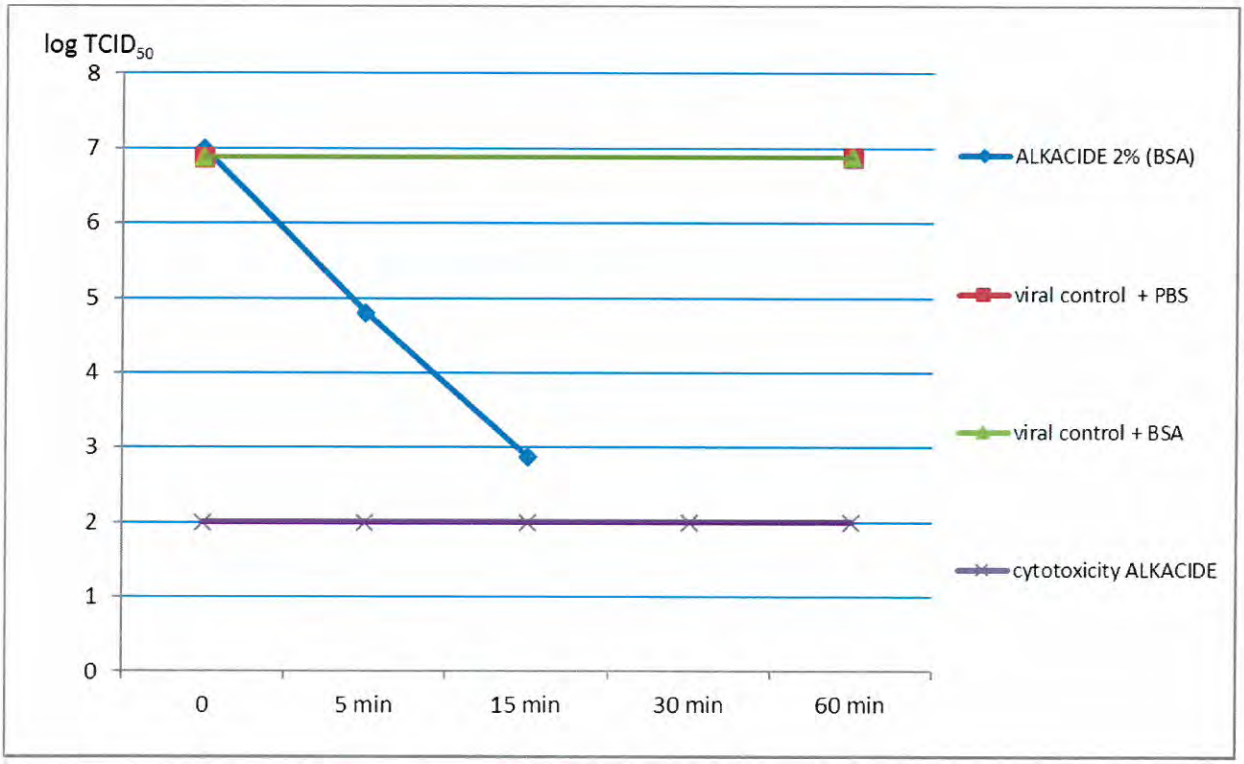


Table A2 — results for the ALKACIDE product and the BVDV in clean conditions (3 g/l BSA)

Product	Concentration	Organic soil load	Cytotoxicity level	Lg $TCID_{50}$					Reduction
				0	5 min	15 min	30 min	60 min	
ALKACIDE trial 1	2,00%	3 g/l BSA	1,875	7	N.T.	2,75	N.T.	N.T.	15 min R = 4,25
ALKACIDE trial 2	2,00%	3 g/l BSA	2	7	N.T.	2,875	N.T.	N.T.	15 min R = 4,125
Formaldehyde Trial 1	0,70%	PBS	2,5	7	6,625	6,375	5,875	N.T.	
Formaldehyde Trial 2	0,70%	PBS	2,5	7	6,75	6,125	5,625	N.T.	
Control of infectivity Trial 1	N.A.	PBS	N.A.	6,875	N.T.	N.T.	N.T.	6,875	
Control of infectivity Trial 1	N.A.	3 g/l BSA	N.A	6,75	N.T.	N.T.	N.T.	6,875	
Control of infectivity Trial 2	N.A.	PBS	N.A	6,875	N.T.	N.T.	N.T.	6,875	
Control of infectivity Trial 2	N.A.	3 g/l BSA	N.A	6,875	N.T.	N.T.	N.T.	6,875	
Sensitivity of the cells	10^{-3}	N.A.	Untreated cells	7	N.T.	7	N.T.	N.T.	
		N.A.	Treated cells	7	N.T.	6,125	N.T.	N.T.	

18, rue Alain SAVARY - 25000 Besançon ▪ Tel: 03.81.25.09.04 ▪ Fax: 03.81.25.53.51▪ SARL au capital de 20 000 € ▪ RCS BESANÇON ▪ N° SIRET 51786053200012 ▪ N° TVA intra FR 23517860532 ▪ info@apexlabo.com

Table A3 — Raw results for the ALKACIDE product in clean conditions (3 g/l BSA), against BVDV

Trial 1

	Concentration	Organic soil load	Time of exposure	Dilutions							
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
ALKACIDE	2,00%	3 g/l BSA	15 min	4444 4444	3342 2333	1100 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			Viral control	4444 4444	4444 4444	3323 2233	1222 2222	1111 1111	1111 1111	1111 0000	0000 0000
ALKACIDE cytotoxicity	2,00%	3 g/l BSA	N.A.	4444 4444	1110 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Formaldehyde	0,70%	PBS	5	4444 4444	4444 4444	4444 4444	2221 2223	2222 2222	1111 1111	1000 0000	0000 0000
			15	4444 4444	4444 4444	4444 4444	1222 2222	1111 1111	1011 1111	0000 0000	0000 0000
			30	4444 4444	4444 4444	2222 2322	1111 1111	1111 1111	1110 0000	0000 0000	0000 0000
Formaldehyde (cytotoxicity)	0,70%	PBS	N.A.	4444 4444	2222 2222	0000 0000	0000 0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
Viral control of infectivity	N.A.	PBS	0	4444 4444	4444 4444	2332 2112	1111 1111	1111 1111	1111 1111	1110 0000	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	3333 3333	1122 1111	1111 1111	1111 1111	1110 0000	0000 0000
Viral control of infectivity	N.A.	3 g/l BSA	0	4444 4444	4444 4444	2222 2332	2122 1111	1111 1111	1111 1111	1100 0000	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	3333 2333	2222 2222	1111 1111	1111 1111	0110 1000	0000 0000

Trial 2

	Concentration	Organic soil load	Time of exposure	Dilutions							
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
ALKACIDE	2,00%	3 g/l BSA	15 min	4444	1111	0011	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	1311	1000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	3333	2222	1111	1111	1111	0000
				4444	4444	3332	2222	1111	1111	0000	0000
ALKACIDE cytotoxicity	2,00%	3 g/l BSA	N.A.	4444	1111	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Formaldehyde	0,70%	PBS	5	4444	4444	4444	2333	2222	1111	1100	0000
				4444	4444	4444	2222	2222	1111	0000	0000
			15	4444	4444	4444	1112	1111	1000	0000	0000
				4444	4444	4444	1111	1111	1111	0000	0000
			30	4444	4444	2111	1111	1111	0010	0000	0000
				4444	4444	1111	1111	1111	0000	0000	0000
Formaldehyde (cytotoxicity)	0,70%	PBS	N.A.	4444	1111	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	2241	0000	0000				
Viral control of infectivity	N.A.	PBS	0	4444	4444	2333	3323	1111	1111	1110	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
			60	4444	4444	2322	1122	1111	1111	1100	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	1000	0000
Viral control of infectivity	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	3333	2211	1111	1111	1011	0000
				4444	4444	3333	1111	1111	1111	0000	0000
			60	4444	4444	3333	2222	1111	1111	1110	0000
				4444	4444	3333	2222	2111	1111	0000	0000

Validations:

Product	Concentration	Organic soil load	Cytotoxicity level	Lg $TCID_{50}$		Reduction > 4 lg	
				0	15 min		
ALKACIDE	1,00%	3 g/l BSA	1,5	6,875	4,125	R= 2,75	INACTIVE
	0,20%		1,5	6,875	6	R= 0,875	INACTIVE

Cells sensitivity:

Product	dilution	Organic soil load		Dilutions						
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
ALKACIDE	10^{-3}	3 g/l BSA	Untreated cells	4444	3333	2112	1111	1111	1110	0000
				4444	3333	2222	1111	1111	1000	0000
			Treated cells	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
				4444	3333	2222	1111	1000	0000	0000

Untreated cells: T_{NT} = 7,000 log $TCID_{50}$

Treated cells : T_T = 6,125 log $TCID_{50}$

18, rue Alain SAVARY - 25000 Besançon ▪ Tel: 03.81.25.09.04 ▪ Fax: 03.81.25.53.51▪ SARL au capital de 20 000 € ▪ RCS BESANÇON ▪ N° SIRET 51786053200012 ▪ N° TVA intra FR 23517860532 ▪ info@apexlabo.com

Service Hygiène Hospitalière
Tél. ligne directe : 20 87 78 22

INSTITUT PASTEUR DE LILLE
FONDATION RECONNUE D'UTILITÉ PUBLIQUE

PROTOCOLE
ETUDE DE L'EFFICACITE DU DESINFECTANT ALKACIDE lot 1095 SUR LE POUVOIR INFECTIEUX DU VIRUS HIV_1 (agent étiologique du S.I.D.A.)

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_1.

Deux tests sont utilisés :

- action du désinfectant sur l'enzyme du virus HIV_1
- étude du pouvoir infectieux résiduel pour la lignée de lymphocytes T humains MT_4.

II - MATERIEL :

a) produit à étudier : ALKACIDE lot 1095 est un désinfectant liquide destiné à la désinfection du matériel thermo sensible d'examen médical.
Parvenu au laboratoire le 1er avril 93, ce produit nous est transmis par le laboratoire ALKAPHARM 83, rue de révilly - 75012 PARIS
pH mesuré au laboratoire : pH 5,2
Couleur : bleue
Odeur : irritante
Conditionnement en flacon plastique de : 250 ml

b) Le virus HIV_1 : le virus (souche $HTLV_{III}B$) est issu d'un surnageant de culture cellulaire $MOLT_4$ 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_4)

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

ce document comporte 8 pages

c) la lignée de cellules T humaines (MT4) 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 réplication 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_1.

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_1 par le désinfectant ALKACIDE lot 1095

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 (CMP équivalents /tube) sont utilisés

a) Le désinfectant étudié ALKACIDE dilué en milieu protéïque (milieu de culture à 10 % de sérum de veau foetal) n'a révélé aucun précipité.
Le virus réparti dans chacun des tubes à réaction, le désinfectant étudié (0,5 ml) est ajouté aux différentes concentrations, homogénéïsé et le temps de contact est respecté (dilutions en eau distillée)
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 repris dans un tampon Tris-EDTA, 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, après 2 lavages en RPMI, sera incubée en présence de cellules MT_4 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 2 semaines après l'apparition d'un ECP caractéristique dans le groupe Témoin virus non traité soit environ 3 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_1.

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_1.

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 00 rpm. Chaque culot viral est resuspendu dans 40µ l 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_2 5 m M

Dithiotreithol 1 m M

poly rA 0,05 OD/ml

oligo dT 12-18 0,05 OD/ml

^3H 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	ALKACIDE	0,25 %	5 mn
A2	ALKACIDE	0,25 %	10 mn
A3	ALKACIDE	0,25 %	15 mn
A4	ALKACIDE	0,5 %	5 mn
A5	ALKACIDE	0,5 %	10 mn
A6	ALKACIDE	0,5 %	15 mn
B Groupe témoin Virus non traité	/	/	15 mn
C Groupe témoin Cellules MT4	/	/	/

TABLEAU II

ACTION DU PRODUIT ALKACIDE SUR LE VIRUS HIV
PAR DOSAGE DE LA REVERSE TRANSCRIPTASE RESIDUELLE

Echantillons	ATI cmp/ml	Activité virale %	Inhibition virucide %
B1 Groupe témoin Virus non traité 15 mn	207684	100	/
ALKACIDE dilué à 0,25 %			
A1 5 mn	2125	1	99,0
A2 10 mn	1286	0,6	99,4
A3 15 mn	1010	0,4	99,6
Témoin positif de la réaction enzymatique	309897		
Témoin négatif de la réaction enzymatique	315		

Ce tableau montre qu'une activité transcriptase inverse minime (car voisine du bruit de fond) est retrouvée après traitement du virus par ALKACIDE dilué à 0,25 % pendant 5, 10 ou 15 minutes.

TABLEAU II Bis

ACTION DU PRODUIT ALKACIDE SUR LE VIRUS HIV
PAR DOSAGE DE LA REVERSE TRANSCRIPTASE RESIDUELLE

Echantillons	ATI cmp/ml	Activité virale %	Inhibition virucide %
B2 Groupe témoin Virus non traité	284213	100	/
Temps de contact 5 mn			
A4 à 50 %	278	0,1	99,9
A5 à 25 %	356	0,1	99,9
A6 à 10 %	336	0,1	99,9
Témoin positif de la réaction enzymatique	318657		
Témoin négatif de la réaction enzymatique (bruit de fond)	198		

Ce tableau montre qu'aucune activité transcriptase inverse n'est retrouvée après traitement du virus par ALKACIDE dilué à 0,5 % pendant 5, 10 ou 15 minutes.

TABLEAU III

ETUDE DU POUVOIR INFECTIEUX RESIDUEL DE
CHAQUE ECHANTILLON PAR CULTURE SUR CELLULES MT_4

Evaluation de l'effet cytopathogène viral (microscopie)							
Echantillons	J+4	J+7	J+10	J+14	J+17	J+21	P24 en pg/ml lyse terminale
C Groupe témoin Cellules MT4	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	299,1 347,6
B1 Groupe témoin Virus non traité	++	++++ détruit	/	/	/	/	> 1000
B2	++	++++ détruit	/	/	/	/	> 1000
ALKACIDE dilué à 0,25 %							
A1 5 mn	0	0	0	0	0	0	218,8
A2 10 mn	0	0	0	0	0	0	394,9
A3 15 mn	0	0	0	0	0	0	299,8
ALKACIDE dilué à 0,5 %							
A4 5 mn	0	0	0	0	0	0	106,2
A5 10 mn	0	0	0	0	0	0	310,7
A6 15 mn	0	0	0	0	0	0	377,6

Ce tableau montre que le pouvoir infectieux n'est pas retrouvé après traitement du virus HIV1 par ALKACIDE dilué à 0,25 % ou 0,5 % pendant 5, 10 ou 15 minutes.

TABLEAU IV

ETUDE DU POUVOIR INFECTIEUX DU SURNAGEANT VIRAL EXPERIMENTAL

(Prise d'essai 100 µl)

Evaluation de l'effet cytopathogène viral sur culture de MT $_4$ par microscopie					Lyse terminale dosage enzymatique de P24 en pg /ml
DILUTIONS DU SURNAGEANT VIRAL EXPERIMENTAL	J+4	J+7	J+10	J+14	
10^{-1}	+++	++++ détruit	/	/	NT
10^{-2}	++++	++++ détruit	/	/	NT
10^{-3}	0	++	++++ détruit	/	> 1000
10^{-4}	0	++	++++	/	> 1000
10^{-5}	0	++	++++ détruit	/	> 1000
10^{-6}	0	0	0	0	170,6
10^{-7}	0	0	0	0	156,8
10^{-8}	0	0	0	0	152,2
Témoin Cellules MT4	0	0	0	0	171,5

CONCLUSION :

Par l'étude conjuguée de la reverse transcriptase et du pouvoir infectieux résiduels, nous concluons que le désinfectant ALKACIDE est actif sur le virus HIV1 lorsqu'il est employé à 0,5 % pendant 5, 10 et 15 minutes.

Lille, le 7 juin 1993

Responsable Technique

Joëlle DEWULF

Chef de Service

Docteur C. KREMBEL

UNI EN 17111:2019

QUANTITATIVE CARRIER TEST FOR THE EVALUATION OF VIRUCIDAL ACTIVITY FOR INSTRUMENTS USED IN THE MEDICAL AREA

TEST PRODUCT F1400

Sample ID:	*19.529590.0006*
Description:	*F1400, Lot. n° F1400190917A*
Ref. AR:	*AR 2019/205/B CAP.2*
Starting date:	*04/11/2019*
Report emission date:	*14/01/2020*
Prepared by:	*Stefania Buso, Francesca Agetta*

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

SAMPLE IDENTIFICATION

- Product Name: F1400
- Batch n°: *F1400190917A*
- Manufactured: n.a.
- Expiry date: n.a.
- Receiving date: 20/09/2019
- Storage condition: room temperature
- Product appearance: liquid, blue color
- Active substance and concentration: GLUTARALDEHYDE (CAS 111-30-8), CHLORURE DE DIDECYLDIMETHYLAMMONIUM (CAS 7173-51-5)

EXPERIMENTAL CONDITIONS

- Test virus and number of passages:
  Adenovirus type 5, strain Adenoid, 75 ATCC VR-5 (passage n° 4)
  Murine Norovirus MNV, strain 599 Berlin Friedrich Loeffler Institute RVB-0651 (passage n° 5)
  Vaccinia virus, strain Ankara, ATCC-VR-1508 (passage n° 6)
- Cell line and number of passages:
  HeLa, ATCC CCL.2 for the propagation of Adenovirus type 5 (passage n° 38+8)
  Raw 264.7, ATCC TIB-71 for the propagation of Murine Norovirus (passage n° 11+8)
  BHK-21-cl 13, IZS-Brescia for the propagation of Vaccinia virus (passage n° 93+6)
- Product test concentrations: 1%, 2%, 5%
- Product diluent: hard water
- Stability and appearance of the mixture during the procedure: Stable, without precipitates
- Interfering substance: Bovine albumin 0.3 % (w/v) (clean conditions)
- Contact time: 15 min ± 10 sec
- Test temperature: 20 ± 1 °C
- Drying time of the inoculate carriers: 30 min
- Neutralization method: Dilution medium
- Growth medium: for Hela and BHK-21 cell lines EMEM, 10% FCS, 2 mM Glutamine, 1 mM Sodium Pyruvate,1% Pen-Strep mix. For RAW 264.7 cell line EMEM (50 Earle's/50 Hank's), 10% FCS, 1 mM L-Glutamine, 1 mM Sodium Pyruvate, 1% Pen-Strep mix.
- Maintenance medium: for Hela and BHK-21 cell lines EMEM, 2% FCS. For RAW 264.7 cell line EMEM (50 Earle's/50 Hank's), 2% FCS.

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

TEST RESULTS

See tables n° 1 to 6.

Table 1: Results of the test UNI EN 17111:2019 on Murine Norovirus contact time 15 min

VIRUS	TEST	CONTACT TIME	SAMPLE	VIRUS TITRATION $logTCID_{50}$	ACCEPTANCE CRITERIA	RESULT
MURINE NOROVIRUS	WATER CONTROL (TEST *Nw*)	0 min	n.a.	7.125 (IC95% = 0.366)	/	/
		15 min	n.a.	7 (IC95% = 0.443)	/	/
	PRELIMINARY CYTOTOXICITY EFFECT	15 min	DONE			
	CELL SUSCEPTIBILITY	n.a.	CONTROL	7.125	< 1	R = 0.125 PASS
			5 %*	7		
	EFFICIENCY FOR SUPPRESSION OF DISINFECTANT ACTIVITY	n.a	5 %	7 (IC95% = 0.378)	≤ 0.5	R = 0 (IC95% = 0.582) PASS
			2%	7.125 (IC95% = 0.366)	≤ 0.5	R = 0.125 (IC95% = 0.575) PASS
			1%	7 (IC95% = 0.443)	≤ 0.5	R = 0 (IC95% = 0.627) PASS
	VIRUCIDAL ACTIVITY (TEST *Na*)	15 min	5 %	≤ 2.5 (IC95% = 0)	R ≥ 4	R ≥ 4.5 (IC95% = 0.443) ***ACTIVE***
			2%	≤ 2.5 (IC95% = 0)	R ≥ 4	R ≥ 4.5 (IC95% = 0.443) ***ACTIVE***
			1%	≤ 2.5 (IC95% = 0)	R ≥ 4	R ≥ 4.5 (IC95% = 0.443) ***ACTIVE***
	REFERENCE VIRUS INACTIVATION TEST	5 min	n.a.	≤ 2.5	R ≥ 4	R ≥ 4.5 PASS

* lowest apparently non cytotoxic dilution. n.a.: not applicable

Table 2: Raw data of the test UNI EN 17111:2019 on Murine Norovirus contact time 15 min

Test	Contact Time	Interfering substance	Concentration	Virus dilutions log_{10}							
				2	3	4	5	6	7	8	9
WATER CONTROL (TEST *Nw*)	0 min	BSA 0.3 g/l	/		4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4000	0000 0000	0000 0000
	15 min		/		4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4440	4444 4000	0000 0000	0000 0000
EFFICIENCY FOR SUPPRESSION OF DISINFECTANT ACTIVITY	/	BSA 0.3 g/l	5 %	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 0000	0000 0000	0000 0000
			2%	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4000	0000 0000	0000 0000
			1%	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4440 0000	4000 0000	0000 0000
VIRUCIDAL ACTIVITY (TEST *Na*)	15 min	BSA 0.3 g/l	5 %		0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			2%		0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			1%		0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Reference Inactivation Test	5 min	/	50 %		0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Susceptibility (Control)	60 min	PBS	/	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 0000	4000 0000	0000 0000
Susceptibility (Product)	60 min	PBS	5%	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 0000	0000 0000	0000 0000

Test	Contact Time	Interfering substance	Concentration	Product dilutions (log_{10})							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Cytotoxicity (Product)	15 min	BSA 0.3 g/l	5%	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

Table 3: Results of the test UNI EN 17111:2019 on Adenovirus contact time 15 min

VIRUS	TEST	CONTACT TIME	SAMPLE	VIRUS TITRATION $logTCID_{50}$	ACCEPTANCE CRITERIA	RESULT
ADENOVIRUS	WATER CONTROL (TEST *Nw*)	0 min	n.a.	6.25 (IC95% = 0.327)	/	/
		15 min	n.a.	6.5 (IC95% = 0)	/	/
	PRELIMINARY CYTOTOXICITY EFFECT	15 min	DONE			
	CELL SUSCEPTIBILITY	n.a.	CONTROL	6.375	< 1	R = 0.125 PASS
			5 %*	6.5		
	EFFICIENCY FOR SUPPRESSION OF DISINFECTANT ACTIVITY	n.a	5 %	6.125 (IC95% = 0.453)	≤ 0.5	R = 0.375 (IC95% = 0.453) PASS
			2%	6.125 (IC95% = 0.366)	≤ 0.5	R = 0.375 (IC95% = 0.366) PASS
			1%	6.25 (IC95% = 0.327)	≤ 0.5	R = 0.25 (IC95% = 0.327) PASS
	VIRUCIDAL ACTIVITY (TEST *Na*)	15 min	5 %	≤ 2.5 (IC95% = 0)	R ≥ 4	R ≥ 4 (IC95% = 0) ***ACTIVE***
			2%	≤ 2.5 (IC95% = 0)	R ≥ 4	R ≥ 4 (IC95% = 0) ***ACTIVE***
			1%	≤ 2.5 (IC95% = 0)	R ≥ 4	R ≥ 4 (IC95% = 0) ***ACTIVE***
	REFERENCE VIRUS INACTIVATION TEST	5 min	n.a.	≤ 2.5	R ≥ 4	R ≥ 4 PASS

* lowest apparently non cytotoxic dilution. n.a.: not applicable

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.

Table 4: Raw data of the test UNI EN 17111:2019 on Adenovirus contact time 15 min

Test	Contact Time	Interfering substance	Concentration	Virus dilutions log_{10}							
				2	3	4	5	6	7	8	9
WATER CONTROL (TEST *Nw*)	0 min	BSA 0.3 g/l	/		4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4400	0000 0000	0000 0000	0000 0000
	15 min		/		4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0000	0000 0000	0000 0000
EFFICIENCY FOR SUPPRESSION OF DISINFECTANT ACTIVITY	/	BSA 0.3 g/l	5 %	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			2%	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			1%	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4400	0000 0000	0000 0000	0000 0000
VIRUCIDAL ACTIVITY (TEST *Na*)	15 min	BSA 0.3 g/l	5 %		0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			2%		0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			1%		0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Reference Inactivation Test	5 min	/	50 %		0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Susceptibility (Control)	60 min	PBS	/	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4400	4000 0000	0000 0000	0000 0000
Susceptibility (Product)	60 min	PBS	5%	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Test	Contact Time	Interfering substance	Concentration	**Product dilutions (log_{10})**							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Cytotoxicity (Product)	15 min	BSA 0.3 g/l	5%	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

Table 5: Results of the test UNI EN 17111:2019 on Vaccinia virus contact time 15 min

VIRUS	TEST	CONTACT TIME	SAMPLE	VIRUS TITRATION $logTCID_{50}$	ACCEPTANCE CRITERIA	RESULT
VACCINIA VIRUS	WATER CONTROL (TEST *Nw*)	0 min	n.a.	6.375 (IC95% = 0.25)	/	/
		15 min	n.a.	6.5 (IC95% = 0)	/	/
	PRELIMINARY CYTOTOXICITY EFFECT	15 min	DONE			
	CELL SUSCEPTIBILITY	n.a.	CONTROL	6.25	< 1	R = 0.25 PASS
			5 %*	6.5		
	EFFICIENCY FOR SUPPRESSION OF DISINFECTANT ACTIVITY	n.a	5 %	6.25 (IC95% = 0.327)	≤ 0.5	R = 0.25 (IC95% = 0.327) PASS
			2%	6.125 (IC95% = 0.366)	≤ 0.5	R = 0.375 (IC95% = 0.366) PASS
			1%	6.25 (IC95% = 0.443)	≤ 0.5	R = 0.25 (IC95% = 0.443) PASS
	VIRUCIDAL ACTIVITY (TEST *Na*)	15 min	5 %	≤ 2.5 (IC95% = 0)	R ≥ 4	R ≥ 4 (IC95% = 0) ***ACTIVE***
			2%	≤ 2.5 (IC95% = 0)	R ≥ 4	R ≥ 4 (IC95% = 0) ***ACTIVE***
			1%	≤ 2.5 (IC95% = 0)	R ≥ 4	R ≥ 4 (IC95% = 0) ***ACTIVE***
	REFERENCE VIRUS INACTIVATION TEST	5 min	n.a.	≤ 2.5	R ≥ 4	R ≥ 4 PASS

* lowest apparently non cytotoxic dilution. n.a.: not applicable

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.

Table 6: Raw data of the test UNI EN 17111:2019 on Vaccinia virus contact time 15 min

Test	Contact Time	Interfering substance	Concentration	Virus dilutions log_{10}							
				2	3	4	5	6	7	8	9
WATER CONTROL (TEST *Nw*)	0 min	BSA 0.3 g/l	/		4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4440	0000 0000	0000 0000	0000 0000
	15 min		/		4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0000	0000 0000	0000 0000
EFFICIENCY FOR SUPPRESSION OF DISINFECTANT ACTIVITY	/	BSA 0.3 g/l	5 %	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4400	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			2%	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			1%	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4000	4000 0000	0000 0000	0000 0000
VIRUCIDAL ACTIVITY (TEST *Na*)	15 min	BSA 0.3 g/l	5 %		0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			2%		0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			1%		0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Reference Inactivation Test	5 min	/	50 %		0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Susceptibility (Control)	60 min	PBS	/	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4400	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Susceptibility (Product)	60 min	PBS	5%	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4440	4000 0000	0000 0000	0000 0000
Test	Contact Time	Interfering substance	Concentration	**Product dilutions (log_{10})**							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Cytotoxicity (Product)	15 min	BSA 0.3 g/l	5%	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000

n.a.: not applicable

CONCLUSIONS

According to UNI EN 17111:2019, under the test conditions applied, the test product F1400, batch n° *F1400190917A*, resulted to have virucidal activity (R ≥ 4) against Adenovirus, Murine norovirus and Vaccinia virus at concentrations 5 %, 2 % and 1 %.

Report digitally signed in accordance with Legislative Decrete No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The test results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. This test report shall not be reproduced except in full, without written approval of Chelab laboratory.
CHELAB S.r.l. Socio Unico, Company subject to the direction and coordination of Mérieux NutriSciences Corporation
Head office: Via Fratta 25, 31023 Resana, Italy. Phone. + 39 0423.7177 / Fax + 39 0423.715058 www.merieuxnutrisciences.it
VAT nr. 01500900269, R.E.A Treviso n. 156079 Fully paid up € 103.480,00.

Institut de
Recherche
Microbiologique

TEST REPORT

N°373/0912-1/M1

ISSUED TO: **ALKAPHARM**
Parc Biocitech
102 avenue Gaston Roussel
93230 ROMAINVILLE

CLEANER PRODUCT: **ALKAZYME**

DESINFECTANT PRODUCT: **ALKACIDE**

TEST REQUEST DATE: 29 August 2012

PRODUCT REFERENCE: 288/0612

TEST: Evaluation of the ability of a two-step cleansing/disinfecting process to eliminate microorganisms

Test on strain *Mycobacterium terrae* CIP 104 321

This report contains 4 pages

This report applies only to the product submitted to test

Issue date: 11 March 2013

Re-issue date: 21 March 2013

Only the french version is valid / seule la version française fait foi

Philippe STROHL
Doctor of veterinary medicine
Scientific Director

I. SAMPLE IDENTIFICATION

Product name:	**ALKAZYME**	**ALKACIDE**
Lot number	2011.07.01.61	2012.04.01.44
Manufacturer	ALKAPHARM Parc Biocitech 102 avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE	
Expiration date	not indicated	not indicated
Recommended product diluent:	tap water	tap water
Aspect of product and its dilutions	White powder	Blue clear liquid
Active substances and concentrations	not indicated	not indicated

Reception date: 25 June 2012

Storage conditions: at room temperature with possible exposure to light

II. EXPERIMENTAL CONDITIONS

Analysis period: from 23 July to 09 August 2012

Experimental conditions and count protocol derived from standard NF T 72-281 (May 2009)

Identification of strain:
Mycobacterium terrae CIP 104 321 — Middlebrook 7H10 agar medium with 10% OADC enrichment. incubation 21 days at 37 ± 1°C

Tested supports:

Supple tubing: PVC infusion tube

Rigid tubing: Stainless steel tubing, diameter 5 mm

Flat support: Stainless steel disk, diameter 2 cm

Interfering substance: dirty conditions derived from standards NF EN 14561 (march 2007) and EN 14562 (September 2006)

Composition: final concentration during the test of 3 g/L of bovine albumin and 3 ml/L of washed sheep erythrocytes

Product diluent used during the test: hard water at 375 mg/kg of CaCO3 (simulated tap water)

Test temperature: between 18 and 25°C

Procedures for each tested strain and support:

1. An inoculum is prepared and mixed one part to nine with the interfering substance to obtain a final deposit of at least 10^6 CFU/support after drying.
2. 0.05 ml of the mix is deposited on the support (single test) and dried.
3. A 0.5% (m/v) solution of **ALKACIDE** is prepared using hard water.
4. The contaminated support is immersed in 100 ml of the solution.
5. The support is scraped to liberate the inoculum.
6. After 15 minutes of the cleansing bath, the support is rinsed with 10 ml of sterile hard water.

⇨ **The microorganisms remaining on the support and in the cleansing bath are counted.**

7. A 2% (m/v) solution of **ALKACIDE** is prepared using hard water.
8. The supports previously cleansed with **ALKACIDE** are immersed in 100 ml of the **ALKACIDE** solution for a 15-minute disinfection bath.
9. They are then rinsed with 10 ml of sterile hard water.

⇨ **The living microorganisms remaining on the support and in the disinfection bath are counted.**

The results obtained at each step are compared to control supports. These latter are treated identically but with a non-bactericidal solution of 0.5% (w/v) Tween 80 at the cleansing step and sterile hard water at the disinfecting step.

III. TES T RESULTS

Mycobacterium terrae CIP 104 321	Test		Control		Log reduction in comparison to the initial contamination of the support
	Bath (CFU / 100 ml)	**Support (CFU / support)**	**Bath (CFU / 100 ml)**	**Support (CFU / support)**	
Rigid tubing – initial contamination: 1.9 x 10^6 CFU/support					
Number of surviving microorganisms after cleansing bath	1.5 x 10^6	4,2 x 10^2	1.4 x 10^6	3.0 x 10^3	**6.28**
Number of surviving microorganisms after cleansing bath and disinfection bath	50	0	4.0 x 10^3	1.6 x 10^2	
Flat support– initial contamination: 1.8 x 10^6 CFU/support					
Number of surviving microorganisms after cleansing bath	1,3 x 10^6	38	1.6 x 10^6	1.6 x 10^3	**6.26**
Number of surviving microorganisms after cleansing bath and disinfection bath	1.4 x 10^2	0	6.0 x 10^3	3.2 x 10^2	
Supple tubing– initial contamination: 1.7 x 10^6 CFU/support					
Number of surviving microorganisms after cleansing bath	1,5 x 10^6	2.3 x 10^2	1,5 x 10^6	2.7 x 10^3	**6.11**
Number of surviving microorganisms after cleansing bath and disinfection bath	70	0	4.2 x 10^3	2.2 x 10^2	

IV. CONCLUSION

No surviving bacteria of the reference strain *Mycobcaterium terrae* CIP 104 321 were found on the supports cleansed with the product **ALKAZYME** then disinfected with the product **ALKACIDE**, regardless of form (tubular or flat) or material (plastic or steel), in accordance with the described protocol. This is in contrast to the control supports, where a close to 2-log living bacterial presence remained.

In contrast, living microorganisms were found in the 3 disinfection baths containing the product **ALKACIDE**, used in accordance with the described protocol for all the supports. However the counts of these surviving microorganisms were 1.6 to 1.9 log less than those of the control baths.

END OF TEST REPORT

GERMANDE *Groupe d'Etude et de Recherche sur les Machines Automatiques de Nettoyage-Désinfection des Endoscopes*

Evaluation de l'efficacité microbiologique d'un protocole de désinfection manuel des fibroscopes digestifs utilisant les produits Alkazyme et Alkacide

Etude effectuée pour :

ALKAPHARM®
30, av. Amiral Lemonnier
78160 MARLY-LE-ROI

Date du rapport
3 avril 1997

Siège : 156, Rue Paradis • 13006 MARSEILLE • Tél. 91 81 97 73 • Fax 91 57 11 64
ASSOCIATION RÉGIE PAR LA LOI DE 1901

Titre del'étude	Evaluation de l'efficacité microbiologique d'un protocole de désinfection manuel des fibroscopes digestifs utilisant les produits Alkazyme et Alkacide
Commanditaire	Alkapharm® (Mr N. Salkin) 30, av. Amiral Lemonnier 78160 MARLY-LE-ROI
Protocole évalué	Protole proposé par la société Alkapharm (annexe 1)
Période de l'étude	Du 6 mai au 27 septembre 1996
Personnes ayant participé à l'étude	. S. Ducki — Externe en Pharmacie / Hygiène Hospitaliée . G. Ducret — Externe en Pharmacie / CAMSP . D. Luu Duc — Pharmacien / Hygiène Hospitalière . B. Rousset — Interne en Pharmacie / CAMSP
Service et association ayant conduit l'étude	. Clinique Médicale et des Maladies Infectieuses (Pr. M. Micoud) - Unité de Santé Publique / Hygiène Hospitalière (Dr. MR. Mallaret) - CHU de Grenoble . GERMANDE (Dr. B. Marchetti)
Lieu de réalisation de l'étude	Services Pharmaceutiques - CAMSP - CHU de Grenoble (Pr. J. Calop)

1- Objectif de l'étude

Evaluer l'efficacité microbiologique de l'ensemble de la procédure d'entretien manuelle des fibroscopes digestifs proposée par la société Alkapharm, faisant intervenir :

- l'Alkazyme, détergent protéolytique bactéricide alcalin
- l'Alkacide, désinfectant faiblement dosé en glutaraldéhyde
- une insufflation forcée avec l'Alkazyme pour compenser l'absence d'écouvillonnage des canaux air/eau (écouvillonnage non réalisable techniquement).

2- Matériel

2-1- Fibroscopes

- 1 coloscope Olympus CF 10 I (n° de série 25 31 704)
- 1 gastroscope Olympus GIFQ 10

Ces deux appareils sont équipés de gaines en bon état.

2-2- Produits d'entretien

- Alkazyme (Alkapharm)
  - . détergent alcalin enzymatique et bactéricide
  - . concentration d'utilisation : 0,5 %
- Alkacide 2 % (Alkapharm)
  - . désinfectant
  - . concentration en glutaraldéhyde potentialisé : 0,17 %

2-3- Microorganismes

- *Pseudomonas aeruginosa* CIP A 22
- *Penicillium verrucosum var. Cyclopium* IP 1231 80
- *Bacillus subtilis var. Niger* CIP 7718

2-4- Matières interférentes

- Matières fécales humaines broyées, mélangées à une solution de NaCl 0,9% stérile
  - . stérilisées à l'autoclave 20 mn à 121°C
  - . de masse volumique proche de 1
  - . dont l'absence d'effet inhibiteur sur la culture de *Bacillus* a été vérifiée

2-5- Solution de récupération

- Flacon type plasma, en verre borosilicaté de 250 ml
- Composition

. tween 80	réf 28830.291 Prolabo	3 % v/v
. lécithine d'œuf	réf 24966.180 Prolabo	0,3 % m/v
. L. histidine	réf 4351 Merck	0,1 % m/v
. eau stérile	500 ml Biosedra	qsp 100 ml

- Autoclavée à 121 °C pendant 20 mn
- Validée dans une étude ultérieure : coefficient de récupération proche de 1

3- Méthode

3-1- Principe

Il s'agit d'une étude effectuée en laboratoire. L'ensemble des canaux (aspiration, biopsie, air/eau) des fibroscopes digestifs sont contaminés artificiellement et prélevés après entretien manuel. Dix essais par microorganismes sont conduits sur les fibroscopes.

3-2- Entretien complet des fibroscopes

Il est effectué après chaque essai afin d'éliminer toute contamination résiduelle.

Il comprend 4 phases :

- nettoyage

Les fibroscopes sont immergés dans la solution détergente bactéricide d'Alkazyme à 0,5%. La solution d'Alkazyme est injectée dans l'ensemble des canaux via l'irrigateur tous conduits. Les canaux d'aspiration (du piston d'aspiration vers le connecteur et du piston d'aspiration vers l'extrémité distale) et à biopsie (de l'entrée du canal à biopsie vers l'extrémité distale) sont écouvillonnés. Les canaux sont ensuite branchés sur une pompe Scope-cleaner II. La crépine est plongée dans la solution d'Alkazyme et le minuteur positionné sur 15 mn.

- rinçage/séchage intermédiaire

Le rinçage est effectué à l'eau du secteur par immersion et irrigation des canaux. Puis de l'air est injecté dans les canaux afin de les vider de leur eau résiduelle.

- désinfection

Les fibroscopes, toujours branchés au scope-cleaner II sont immergés dans la solution désinfectante d'Alkacide (Alkacide 5% pour les essais réalisés antérieurement avec *Bacillus subtilis*, Alkacide 2% pour ceux réalisés antérieurement avec les deux autres microorganismes). La crépine est plongée dans la solution d'Alkacide et le minuteur positionné sur le temps de contact défini (60 mn pour les essais réalisés antérieurement avec *Bacillus subtilis*, 20 mn pour ceux réalisés antérieurement avec les deux autres microorganismes).

- rinçage/séchage final

Le rinçage est effectué à l'eau du secteur par immersion et irrigation des canaux. De l'air pris au-dessus d'une flamme est ensuite injectée dans les canaux afin de les vider de leur eau résiduelle.

3-3- Contamination des canaux

- inoculums microbiens

Les milieux de culture (géloses pour dénombrement et entretien des souches) et les liquides de préparation des suspensions microbiennes sont ceux préconisés dans les normes AFNOR NF T 72-151, 72-201 et 72-231. Les inoculums sont numérés par dilutions sucessives sur gélose de dénombrement.

- contamination

15 ml d'un mélange comprenant 6 ml de matière fécale et 9 ml de suspension microbienne sont introduits dans les canaux d'aspiration, à biopsie et air/eau, par l'intermédiaire d'un irrigateur tous conduits, à l'aide d'une seringue. Après 30 mn d'incubation à la température de la pièce (environ 25 °C), l'entretien débute.

3-4- Entretien des canaux (cf annexe 1)

Passé ce délai d'une demi-heure, les fibroscopes sont nettoyés et désinfectés manuellement selon le protocole Alkapharm® comportant les phases suivantes :

- aspiration

. aspiration des canaux aspiration et à biopsie avec la solution d'Alkazyme 0,5% pendant 1 mn

- écouvillonnage

. écouvillonnage des canaux d'aspiration et à biopsie (cf § 3-2)

- insufflation

. insufflation forcée pendant 30 s afin de faire passer de la solution d'Alkazyme 0,5% dans le canal air/eau

- détergence chimique

. immersion du fibroscope 15 mn dans la solution d'Alkazyme 0,5%

- rinçage

. immersion du fibroscope dans un bac contenant de l'eau du secteur

. injection d'environ 400 ml d'eau du secteur dans l'ensemble des canaux à l'aide d'une seringue via l'irrigateur tous conduits

- désinfection

. immersion du fibroscope dans un bac contenant la solution d'Alkacide 2%

. injection d'Alkacide 2% dans l'ensemble des canaux à l'aide d'une seringue via l'irrigateur tous conduits

. temps de contact 15 mn

- rinçage final

. immersion du fibroscope dans un bac contenant de l'eau du secteur

. injection d'environ 400 ml d'eau du secteur dans l'ensemble des canaux à l'aide d'une seringue via l'irrigateur tous conduits

- séchage

3-5- Prélèvements des canaux

Ils sont effectués avant contamination des canaux afin de vérifier l'absence de contamination résiduelle et après entretien des fibroscopes.

Après installation de l'irrigateur tous conduits, mise en place sur l'embout d'aspiration du fibroscope d'une petite tubulure stérile (morceau de connecteur à oxygène), obturation du canal à biopsie avec du Parafilm® (décontaminé à l'alcool) et installation de l'embout distal et du connecteur à la source dans un bol stérile, on injecte 3 fois 50 ml de la solution de récupération dans l'ensemble des canaux à l'aide d'une seringue, via l'irrigateur tous conduits. Afin de tout récupérer, de l'air pris au-dessus d'une flamme est ensuite injectée dans les canaux.

3-6- Traitement des prélèvements

Les prélèvements sont filtrés sur une membrane stérile en nitrate de cellulose 0,45 µm. Les membranes sont rinçées 3 fois avec 50 ml de solution stérile de NaCl à 0,9%. Les membranes sont mises en culture sur la gélose de dénombrement adéquate pendant un temps d'incubation convenable. Les colonies sont ensuite dénombrées et identifiées.

Souche	Température	Durée de culture
* *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22	37°C +/-1°C	48 heures
* *Penicillium verrucosum var. Cyclopium* IP 1231 80	24°C +/-1°C	96 heures
* *Bacillus subtilis* var. *niger* CIP 7 718	30°C +/-1°C	72 heures

4- Résultats

Tableau I

Pseudomonas aeruginosa			
	Type de fibroscope	**Nombre d'ufc injecté en log**	**Réduction logarythmique après entretien**
	Gastroscope	9,06	7,04
	Coloscope	9,06	7,32
	Coloscope	9,05	8,45
	Coloscope	9,03	6,41
	Gastroscope	9,02	6,86
	Coloscope	9,03	6,88
	Gastroscope	8,96	6,75
	Coloscope	8,96	8,96
	Gastroscope	8,91	6,81
	Coloscope	8,91	6,71
	Coloscope	9	7,44
Moyenne ± écart-type		9,00 ± 0,06	7,24 ± 0,79
Cœfficient de variation		0,6 %	10,9 %

Tableau II

Penicillium verrucosum			
	Type de fibroscope	**Nombre d'ufc injecté en log**	**Réduction logarythmique après entretien**
	Gastroscope	7,04	7,04
	Coloscope	7,04	6,56
	Gastroscope	7,03	7,03
	Coloscope	7,03	6,43
	Gastroscope	6,98	6,98
	Coloscope	6,98	6,98
	Gastroscope	7,07	7,07
	Coloscope	7,07	6,59
	Gastroscope	7,10	7,10
	Coloscope	7,10	7,10
Moyenne ± écart-type		7,04 ± 0,05	6,89 ± 0,26
Cœfficient de variation		0,7%	3,8%

Germande
Avril 97

Tableau III

Bacillus subtilis			
	Type de fibroscope	**Nombre d'ufc injecté en log**	**Réduction logarythmique après entretien**
	Gastroscope	8,32	5,90
	Coloscope	8,32	6,45
	Gastroscope	8,35	5,31
	Coloscope	8,35	5,29
	Gastroscope	8,27	5,91
	Coloscope	8,27	6,43
	Gastroscope	8,39	5,60
	Coloscope	8,39	5,82
	Gastroscope	8,34	7,23
	Coloscope	8,34	6,53
Moyenne ± écart-type		8,33 ± 0,04	6,05 ± 0,61
Cœfficient de variation		0,5 %	10,0 %

5- Discussion/Conclusion

Les résultats de cette étude montre que le protocole d'entretien des fibroscopes digestifs proposé par la société Alkapharm® utilisant les produits Alkazyme 0,5% et Alkacide 2% pendant 15 mn chacun est efficace.

Deux remarques peuvent néanmoins être apportées :

- la première concerne une optimisation de la phase 3 du protocole proposé par la société Alkapharm®, à savoir la mise en place de l'irrigateur tous conduits permettant d'injecter dans l'ensemble des canaux de l'Alkazyme 0,5% en laissant un temps de contact de 15 mn. En effet, dans le protocole évalué, les canaux d'aspiration et à biopsie ne sont en contact avec l'Alkazyme que pendant la minute d'aspiration et la phase d'écouvillonnage et le canal air/eau que pendant les 30 s d'insufflation forcée. L'efficacité de la procédure pourrait être ainsi augmentée et la variabilité des résultats abaissée.

- la deuxième concerne les canaux érecteur et jet d'eau (non pris en compte dans l'étude) qu'il est nécessaire de traiter quand ils existent.

Grenoble, le 3 avril 1997

Dominique Luu Duc
Docteur en Pharmacie

Germande
Avril 97

Annexe 1

Germande
Avril 97

PROTOCOLE DE NETTOYAGE PREDESINFECTANT ET DE DESINFECTION DES FIBROSCOPES ET ENDOSCOPES SOUPLES

Service de Gastro-Entérologie

Le Chef de Service:

Service Pharmacie

Le Pharmacien:

La Surveillante:

Nettoyer la gaine de l'appareil dès son retrait a l'aide d'une compresse imbibée d'Alkazyme.

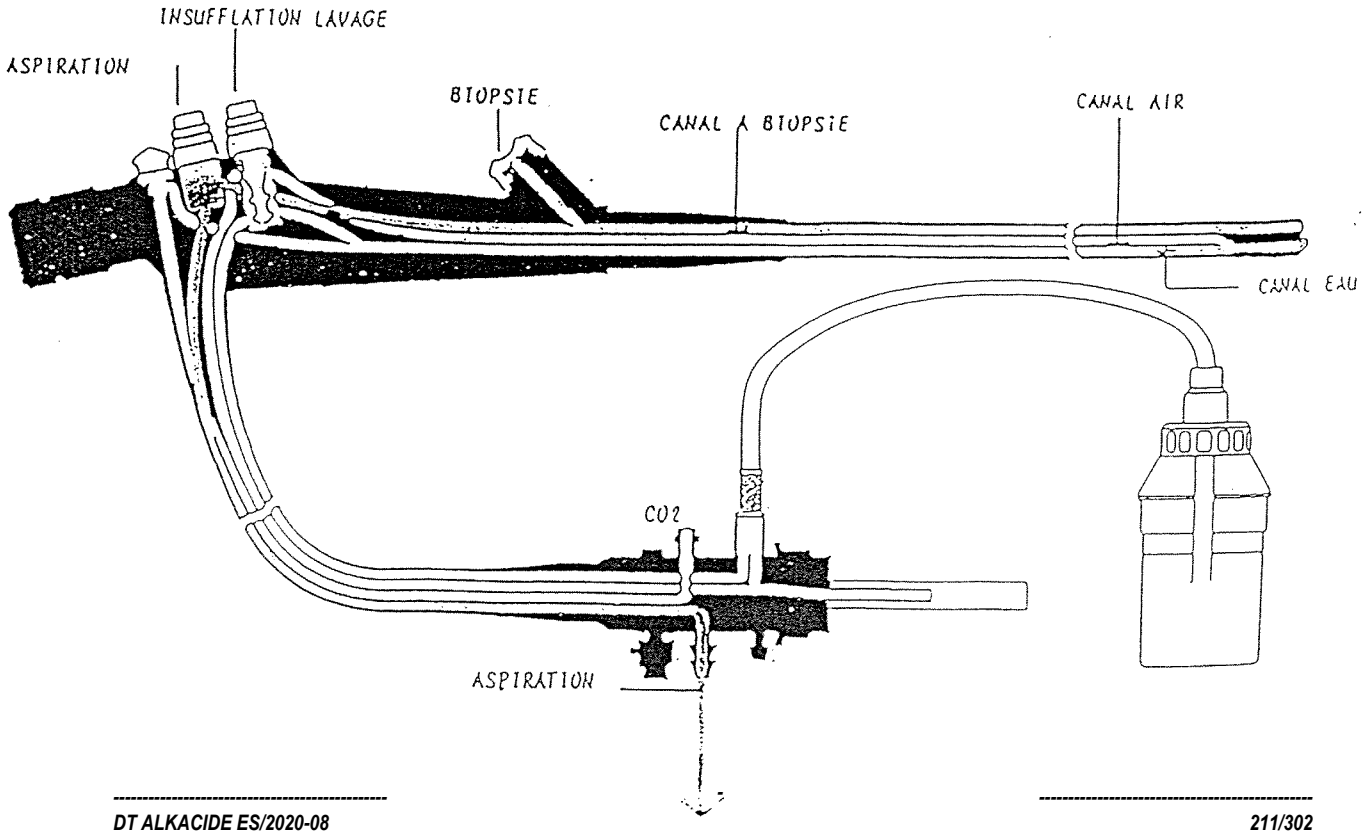
Maintenir l'endoscope branché sur la source

Phase 1: ASPIRATION

- Cette opération permet:

- L'élimination des souillures protéiques
- La préparation à l'écouvillonnage

La procédure d'**ASPIRATION** doit s'effectuer en maintenant la gaine distale immergée dans la solution d'ALKAZYME et en maintenant une pression sur le piston d'aspiration pendant 1 minute.

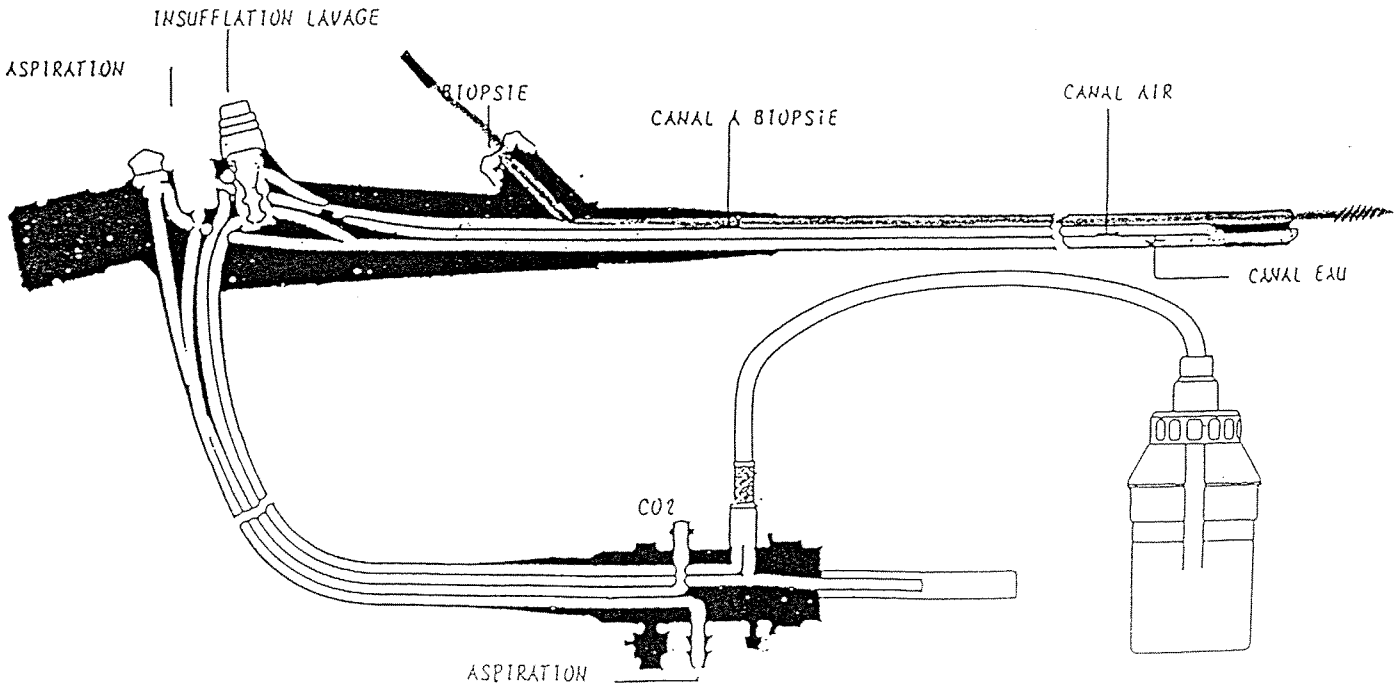


Phase 2: ECOUVILLONNAGE

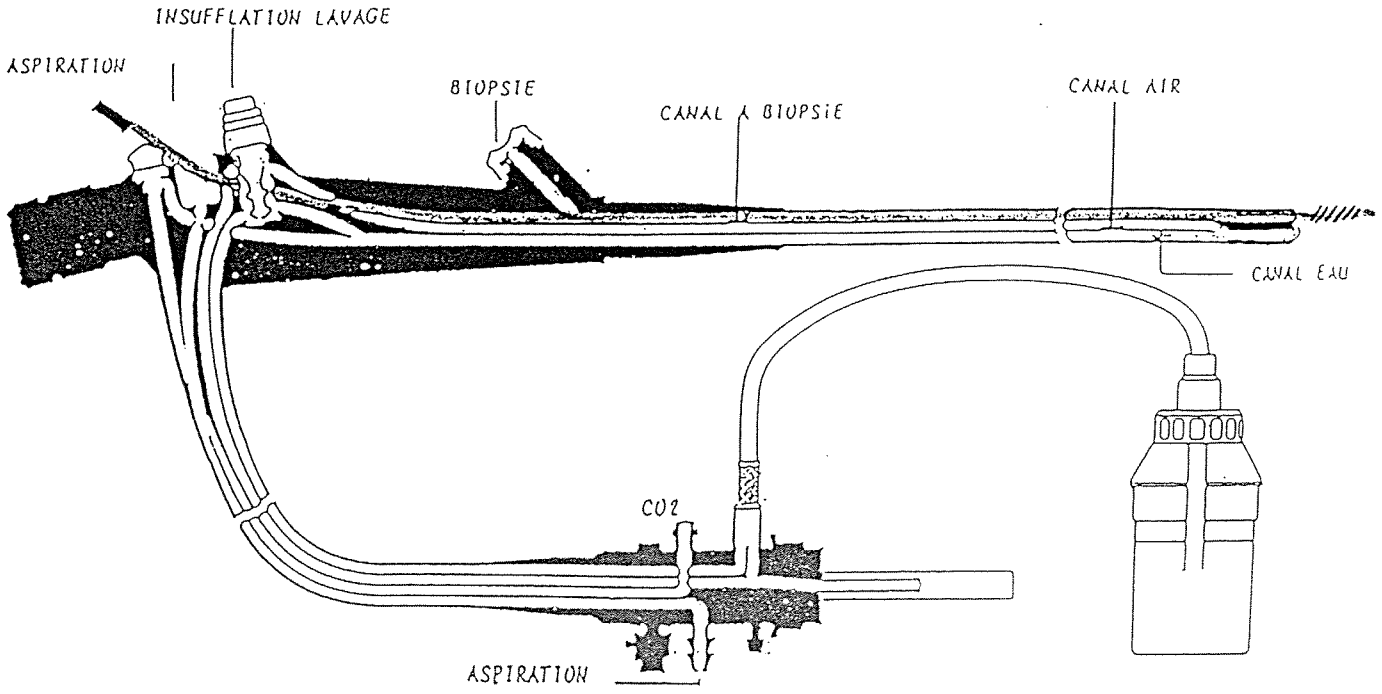
Seul, le canal opérateur (aspiration/biopsie) peut être nettoyé mécaniquement par écouvillonnage.

- Ecouvillonner par l'entrée du canal opérateur en s'assurant que l'écouvillon réaparaisse à l'extrémité de la gaine et nettoyer les soies de l'écouvillon avant de le retirer.

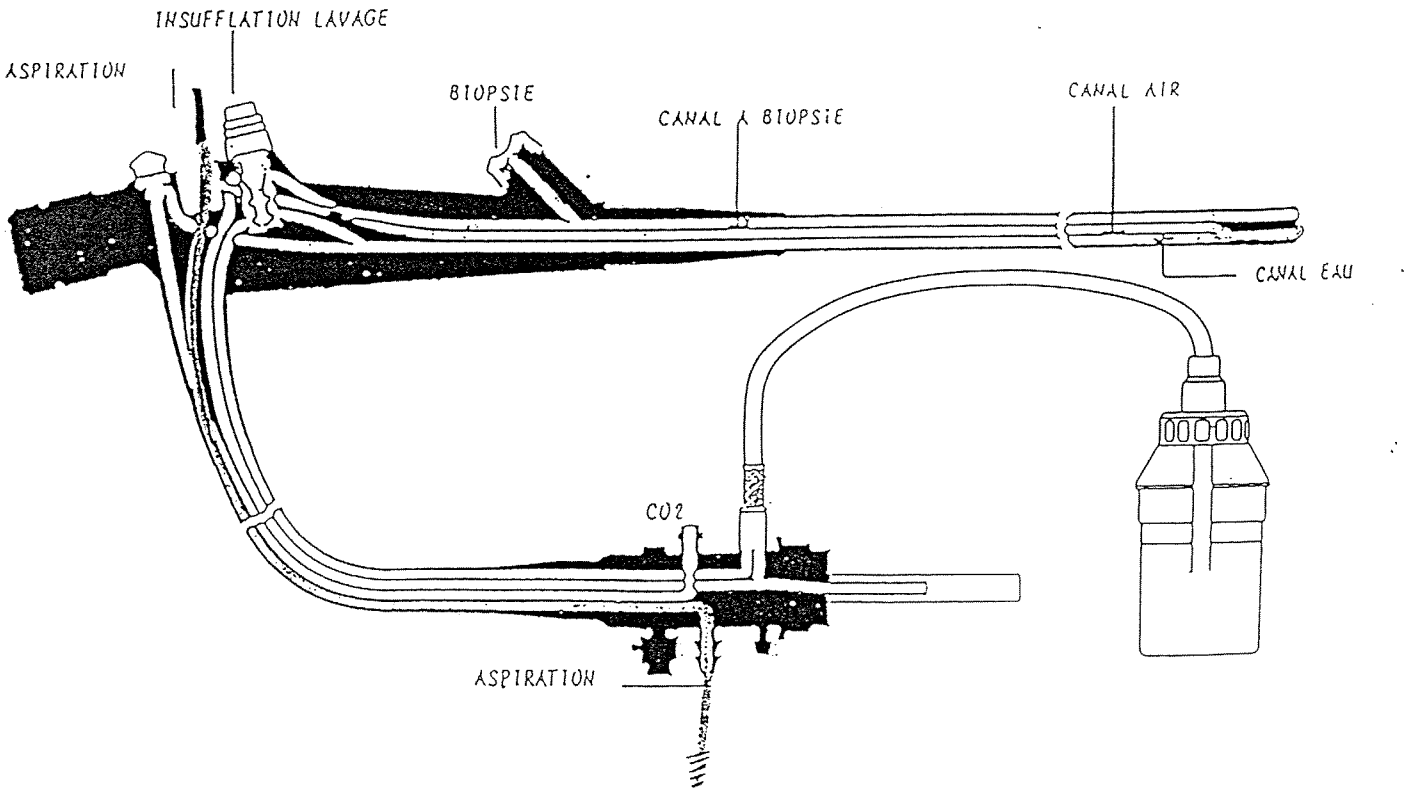
- Oter le piston d'aspiration et répéter la même opération en introduisant l'écouvillon à l'entrée du piston d'aspiration (fig. 2) et à l'emplacement du piston mais en direction de la source (fig. 3)



Ecouvillonnage canal biopsie



Ecouvillonnage canal aspiration → canal à biopsie



Ecouvillonnage canal aspiration vers la source

Phase 3 : INSUFFLATION

Opération ayant pour but de compenser l'absence d'écouvillonnage des canaux Air/Eau.

Oter de la source la fiole d'eau et la remplacer par une autre fiole identifiée contenant une solution d'ALKAZYME.

Oter le piston Air/Eau et positionner le piston bleu (piston d'insufflation). Maintenir le piston enfoncé afin de forcer la solution d'ALKAZYME de la fiole dans les canaux Air et Eau (inaccessibles à l'écouvillon.) Cette opération dure environ 30 secondes.

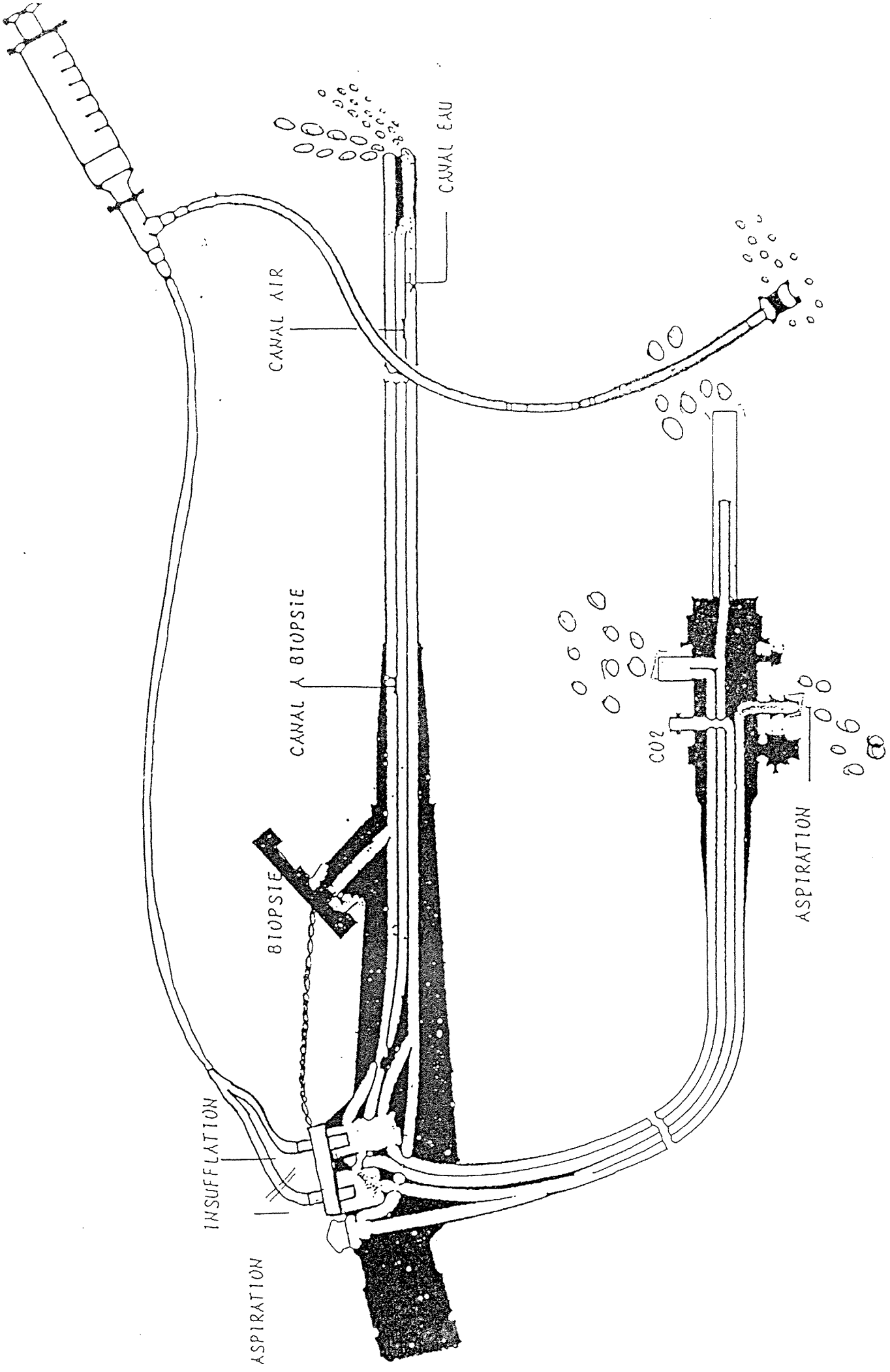
Procéder au nettoyage externe de l'appareil par immersion dans le bain d'ALKAZYME.

Rincer à l'eau claire et changer le bac d'eau de rinçage après chaque opération.

Repositionner la fiole d'examen (eau) sur la source et insuffler de l'eau afin de rincer les canaux Air/Eau. L'action protéolytique d'ALKAZYME aura digéré les souillures adhérentes aux parois et le rinçage assurera leur évacuation.
Dès disparition de la mousse à la sortie de l'endoscope, celui ci pourra être considéré comme rincé.

Procéder ensuite au rinçage du canal opérateur en aspirant de l'eau claire.

Procéder au nettoyage externe de l'appareil par immersion dans un bain d'eau claire.

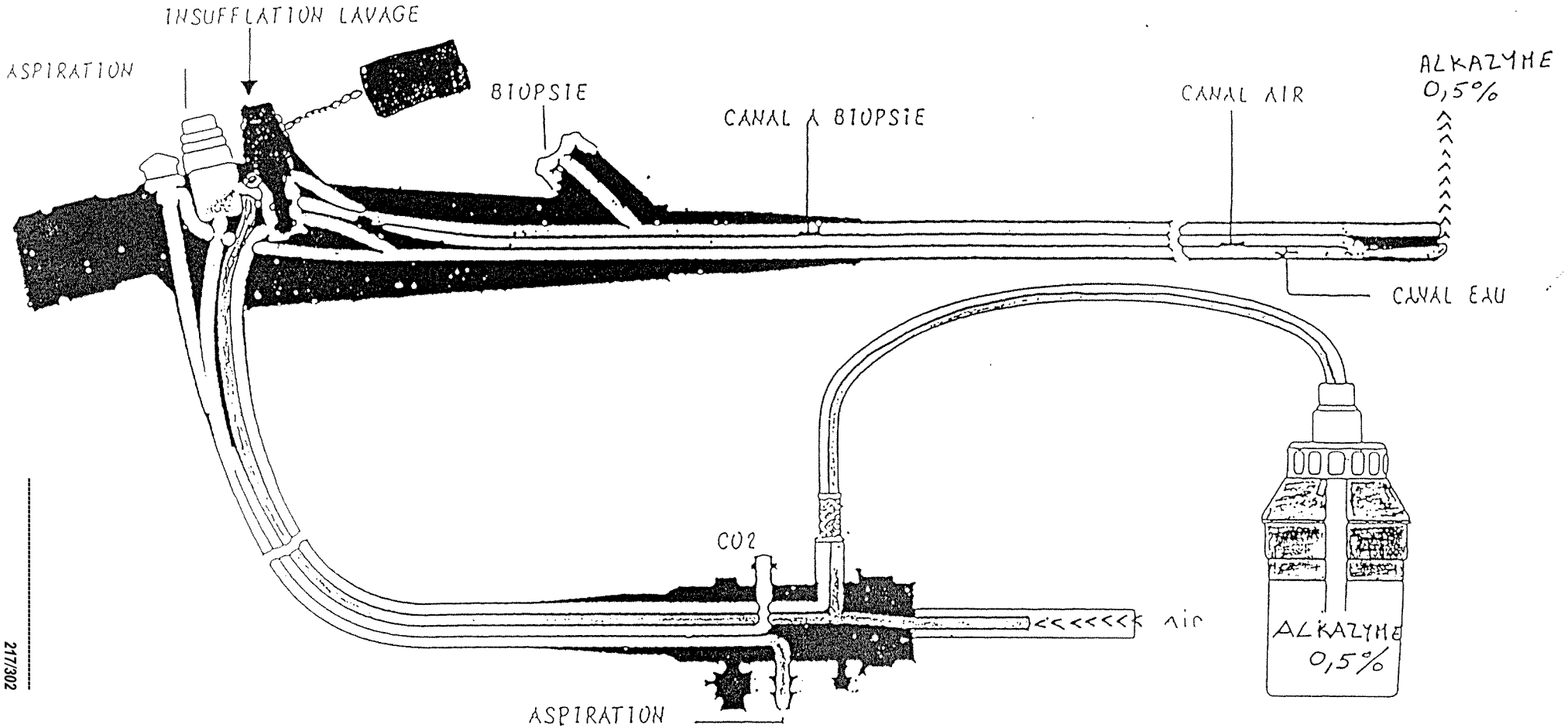

CANAL EAU
CANAL AIR
CANAL A BIOPSIE
BIOPSIE
CO2
ASPIRATION
INSUFFLATION
ASPIRATION

Phase 4 : DESINFECTION

- Oter les deux pistons (aspiration/insufflation) et connecter l'irrigateur tous conduits.

Exercer plusieurs pressions successives afin d'évacuer l'air des conduits et d'introduire le désinfectant.

Dès disparition des bulles d'air, laisser le désinfectant ALKACIDE en contact pendant 15 minutes.


INSUFFLATION LAVAGE
ASPIRATION
BIOPSIE
CANAL A BIOPSIE
CANAL AIR
ALKAZYME
0,5%
CANAL EAU
CO2
air
ALKAZYME
0,5%
ASPIRATION

Phase 5: RINCAGE

Rincer à l'eau claire selon la même méthode que pour la désinfection (phase 4) en changeant le bac de rinçage après chaque usage.

Phase 6: SECHAGE

Connecter l'endoscope à la source, sans les pistons, en ayant préalablement essuyé les connecteurs de la lumière froide.

Obturer l' emplacement du piston Air/Eau et le connecteur de la fiole.

Brancher la source et sélectionner le débit d'air sur la position maximale.

Cette opération doit durer 30 secondes.

Maintenir l'endoscope branché à la source et connecter la tubulure d'aspiration.

Obturer l'orifice du piston d'aspiration et attendre 30 secondes pour l'évacuation de l'eau de rinçage.

Entre chaque patient, reprendre le protocole à la phase 1 et après la non utilisation du matériel au delà de 6 heures, reprendre le protocole à la phase 4 avant le premier patient.

EVIC-CEBA
LABORATOIRE DE RECHERCHE ET D'EXPERIMENTATION

RAPPORT D'ETUDE : T 267/4545 du 23 Août 1994

ALKAPHARM

Toxicité orale aiguë chez la Souris
de la préparation

Alkacide – Lot 1096

(DL50)

BG/CP

Ce rapport contient 20 pages

Z.I. - 33295 BLANQUEFORT - FRANCE
TÉLEX 550 717 - FAX 56 95 05 22
TÉL. 56 35 02 25

1, rue Massue - 94300 VINCENNES - FRANCE
FAX (1) 48 08 62 31
TÉL. (1) 43 65 03 03

S.A. AU CAPITAL DE 2 400 000 FRS - RC 70B70 BORDEAUX - SIRET 470 200 700 00016 - FR 79470200700

Laboratoire accrédité par le
Réseau National d'Essais sous le n° 29.85/01

Toxicité orale aiguë chez la Souris de la préparation

Alkacide – Lot 1096

(DL50)

Référence de l'étude	: T 267/4545
Protocole utilisé	: ligne directrice 401 de l'OCDE
Produit étudié	: Alkacide – Lot 1096
Commanditaire	: ALKAPHARM
Moniteur de l'étude	: S. MERCIER
Lieu de réalisation de l'étude	: EVIC CEBA – 33295 BLANQUEFORT
Technicien responsable	: Martine MIERMON
Directeur de l'étude	: Philippe DUFOUR
Assurance Qualité	: Patrick GOMOND
Directeur du Laboratoire d'Essai	: Philippe MASSON
Dates d'essai	
Début d'étude	: 26 Mai 1994
Fin d'étude	: 09 Juin 1994

26/08/94

24/08/94

25.08.94

RESULTAT ET CONCLUSION

L'administration orale unique de la préparation **Alkacide – Lot 1096** chez la Souris mâle et femelle provoque la mort de 0 %, 50 %, 70 % et 90 % des animaux traités aux doses respectives de 1600, 1790, 2000 et 2500 mg/kg. Les signes de toxicité (piloérection, perte d'activité, ptose palpébrale) apparaissent 3 à 5 heures après les traitements.
L'examen autopsique des animaux morts pendant l'essai révèle des lésions de l'estomac : météorisme, parois fines.

Dans les conditions expérimentales adoptées, la DL50 de la préparation étudiée déterminée par voie orale chez la Souris mâle et femelle est égale à 1800 mg/kg (1590 – 2038 mg/kg). La dose maximum non létale est supérieure à 1600 mg/kg.

Selon la directive 67/548/CEE, la préparation testée peut être classée parmi les substances **nocives** en cas d'ingestion.

Le rapport d'étude ne concerne que l'objet soumis à l'essai.

1. INTRODUCTION

. But de l'étude

Evaluer les propriétés toxiques d'une substance ou d'une préparation administrée par voie orale chez la Souris en une dose unique.

. Protocole utilisé

L'essai est réalisé selon la ligne directrice 401 de l'OCDE.

2. PRODUIT ETUDIE

- Dénomination, référence : Alkacide – Lot 1096
- Aspect : liquide bleu
- Quantité reçue, conditionnement : 250 ml, flacon en plastique
- Date de réception : 10 Mai 1994
- Numéro d'enregistrement au Laboratoire : 4545
- Fiche de renseignement : non communiquée
- Contrôle de l'homogénéité : non exigé pour les études inférieures à 28 jours
- Stockage : à température ambiante, à l'abri de la lumière
- Archivage : échantillon de produit conservé pendant 10 ans. Le rapport final et les données brutes de l'essai sont archivés dans la salle réservée à cet effet, dans le Laboratoire d'Essai.
- Véhicule utilisé : eau distillée (Méram Lot 43209)

3. MODE OPERATOIRE

. Système réactif

- Espèce, souche, origine : Souris NMRI Han EOPS, animalerie de production EVIC–CEBA (33295 – BLANQUEFORT, France).
- Nombre, sexe : 40, 20 mâles et 20 femelles
- Age, poids : 5 semaines environ, entre 18 et 22 g

- Stabulation, nourriture : 5 par sexe et par cage en polypropylène de dimension 46,5 x 15 x 14 cm. Maintenance environnementale conforme aux exigences de la directive 86/609/CEE. Aliment granulé UAR A04-10 (91360 - EPINAY SUR ORGE, FRANCE).

. Traitements

* *Voie d'administration*

Voie orale (gavage), les animaux ayant été mis à jeun 4 heures avant le traitement.

* *Doses*

Lot 1 : 1600 mg/kg
Lot 2 : 1790 mg/kg
Lot 3 : 2000 mg/kg
Lot 4 : 2500 mg/kg

Ces doses ont été choisies à la suite d'un essai préliminaire réalisé sur 10 souris.

* *Véhicule*

Eau distillée. Les préparations sont maintenues sous agitation magnétique pendant la durée des traitements.

* *Volume administré* : volume constant de 20 ml/kg.

. Observations

Les animaux sont gardés en observation 14 jours après le traitement.

* *Examens cliniques*

- une observation clinique est pratiquée au moins une fois par jour afin de noter les modifications de l'aspect, du comportement et des fonctions végétatives des animaux traités. Une observation clinique individuelle est réalisée 1 heure après le traitement (tableaux 1.a à 1.d en annexe). Ces examens sont poursuivis au cours des 5 heures suivantes, puis quotidiennement jusqu'à la fin de l'essai.

- le poids corporel de chaque animal est déterminé immédiatement avant le traitement (J1) puis 3, 7 et 14 jours après l'administration de la substance à tester.

* *Examens autopsiques*

A la fin de la période d'observation, tous les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale puis autopsiés. Toutes les altérations pathologiques macroscopiques sont enregistrées.
Aucun prélèvement tissulaire n'est effectué.

. Evaluation de la DL50

Si les résultats le permettent, la DL50 est calculée par la méthode de Litchfield et Wilcoxon, présentée par Ch. Dupont (Fiche Technique n° 6, J. Pharmacologie Paris, 1970, 1, 3, 407).

. Interprétation des résultats

Conformément à la directive 67/548/CEE, la classification de la substance testée est déterminée en fonction de sa toxicité aiguë exprimée en DL50.

. Substance très toxique en cas d'ingestion :

DL50 ≤ 25 mg/kg,

. Substance toxique en cas d'ingestion :

25 mg/kg < DL50 ≤ 200 mg/kg,

. Substance nocive en cas d'ingestion :

200 mg/kg < DL50 ≤ 2000 mg/kg.

. Substance non dangereuse en cas d'ingestion :

DL50 > 2000 mg/kg

4. RESULTATS ET CONCLUSION

4.1. Examens cliniques

. Mortalité

La mortalité et le moment de la mort en fonction des doses administrées sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

Lots		1		2		3		4	
Doses (mg/kg)		1600		1790		2000		2500	
Nombre d'animaux par sexe		5M	5F	5M	5F	5M	5F	5M	5F
MORTALITE	dans les 24 heures (J2)	-	-	1	4	3	3	4	5
	J2 – fin d'observation	-	-	-	-	-	1	-	-
TOTAL		0	0	1	4	3	4	4	5
Pourcentage des mortalités cumulées		0		50		70		90	

Les taux de mortalité augmentent en fonction des doses administrées. La quasi totalité des mortalités surviennent dans les 24 heures suivant le traitement. Il n'y a pas de différence entre sexes.

. Symptomatologie

. après 1 heure (tableaux 1.a à 1.d) : aucun signe de toxicité visible chez les animaux des 4 lots.

. après 3 heures : légère piloérection visible chez les animaux du lot 4.

. après 5 heures : légère piloérection visible chez les animaux du lot 3. Les animaux traités avec la forte dose (2500 mg/kg) présentent des signes toxiques : animaux en boule, peu d'activité et ptose palpébrale.

Toutes les mortalités sont observées 24 heures après le traitement (J2) à l'exception de celle du rat femelle n° 0909 du lot 3 (2000 mg/kg) enregistrée 72 heures après le gavage (J4).

Les animaux survivants ne présentent aucun comportement anormal.

4.2. Evolution pondérale (tableaux 2.m.a à 2.f.d)

L'évolution pondérale des animaux survivants n'a pas été altérée par le traitement.

4.3. Examens autopsiques (tableaux 2.m.a à 2.f.d)

L'examen autopsique a été systématiquement effectué sur les animaux morts spontanément en cours d'étude ou sacrifiés à la fin de l'essai.

Cet examen a révélé :

- chez les animaux des 3 lots morts dans les 24 heures suivant le traitement une météorisation de l'estomac, rempli d'un liquide visqueux (produit) et de particules de nourriture. Les parois sont très fines.

- chez l'animal du lot 3 mort 72 heures après le traitement (souris n° 909), des lésions identiques à celles notées ci-dessus et l'aspect hémorragique du duodénum. L'iléon et le jéjunum sont presque vides.

- chez les animaux des 4 lots autopsiés 14 jours après le traitement, l'absence de toute lésion organique ou tissulaire.

4.4. Evaluation de la DL50

La DL50 de la préparation étudiée pour les deux sexes cumulés avec ses intervalles de confiance de 95 % calculée à partir du graphique reporté en tableau 3 établi selon la méthode de LITCHFIELD et WILCOXON est :

DL50 par voie orale = 1800 mg/kg (1590 -2038 mg/kg).

La dose maximum non létale de la préparation est supérieure à 1600 mg/kg.

4.5. Interprétation des résultats

Selon la directive 67/548/CEE, la préparation **Alkacide - Lot 1096** doit être classée parmi les substances **nocives** en cas d'ingestion.

N° étude : T 267 / 4545 **LOT 1** **– VOIE ORALE –**

DOSE : 1600 mg/Kg de Produit

Espèce : SOURIS J1 : 26.05.94 Opérateur : M.M

– Tableau 1a –

OBSERVATIONS CLINIQUES (+ 1 h.)

	MALES				
N° animaux	0884	0885	0886	0887	0888
Activité Spontanée	N	N	N	N	N
Reflexe de Preyer (bruit)	N	N	N	N	N
Effet respiratoire	N	N	N	N	N
Convulsions	0	0	0	0	0
Tremblements	0	0	0	0	0
Température	N	N	N	N	N
Tonus musculaire	N	N	N	N	N
Ptose palpébrale	N	N	N	N	N
Mydriase	N	N	N	N	N
Salivation / Larmes	N	N	N	N	N
Reflexe de Retournement	N	N	N	N	N
Piloérection	N	N	N	N	N

	FEMELLES				
N° animaux	0889	0890	0891	0892	0893
Activité Spontanée	N	N	N	N	N
Reflexe de Preyer (bruit)	N	N	N	N	N
Effet respiratoire	N	N	N	N	N
Convulsions	0	0	0	0	0
Tremblements	0	0	0	0	0
Température	N	N	N	N	N
Tonus musculaire	N	N	N	N	N
Ptose palpébrale	N	N	N	N	N
Mydriase	N	N	N	N	N
Salivation / Larmes	N	N	N	N	N
Reflexe de Retournement	N	N	N	N	N
Piloérection	N	N	N	N	N

LEGENDE : N : Normal 0 : Absence

N° étude : T 267 / 4545 **LOT 2** **– VOIE ORALE –**

DOSE : 1790 mg/Kg de Produit

Espèce : SOURIS J1 : 26.05.94 Opérateur : M.M

– Tableau 1b –

OBSERVATIONS CLINIQUES (+ 1 h.)

	MALES				
N° animaux	0894	0895	0896	0897	0898
Activité Spontanée	N	N	N	N	N
Reflexe de Preyer (bruit)	N	N	N	N	N
Effet respiratoire	N	N	N	N	N
Convulsions	0	0	0	0	0
Tremblements	0	0	0	0	0
Température	N	N	N	N	N
Tonus musculaire	N	N	N	N	N
Ptose palpébrale	N	N	N	N	N
Mydriase	N	N	N	N	N
Salivation / Larmes	N	N	N	N	N
Reflexe de Retournement	N	N	N	N	N
Piloérection	N	N	N	N	N

	FEMELLES				
N° animaux	0899	0900	0901	0902	0903
Activité Spontanée	N	N	N	N	N
Reflexe de Preyer (bruit)	N	N	N	N	N
Effet respiratoire	N	N	N	N	N
Convulsions	0	0	0	0	0
Tremblements	0	0	0	0	0
Température	N	N	N	N	N
Tonus musculaire	N	N	N	N	N
Ptose palpébrale	N	N	N	N	N
Mydriase	N	N	N	N	N
Salivation / Larmes	N	N	N	N	N
Reflexe de Retournement	N	N	N	N	N
Piloérection	N	N	N	N	N

LEGENDE : N : Normal 0 : Absence

N° étude : T 267 / 4545 **LOT 3** **- VOIE ORALE -**

DOSE : 2000 mg/Kg de Produit

Espèce : SOURIS J1 : 26.05.94 Opérateur : M.M

- Tableau 1c -

OBSERVATIONS CLINIQUES (+ 1 h.)

	MALES				
N° animaux	0904	0905	0906	0907	0908
Activité Spontanée	N	N	N	N	N
Reflexe de Preyer (bruit)	N	N	N	N	N
Effet respiratoire	N	N	N	N	N
Convulsions	0	0	0	0	0
Tremblements	0	0	0	0	0
Température	N	N	N	N	N
Tonus musculaire	N	N	N	N	N
Ptose palpébrale	N	N	N	N	N
Mydriase	N	N	N	N	N
Salivation / Larmes	N	N	N	N	N
Reflexe de Retournement	N	N	N	N	N
Piloérection	N	N	N	N	N

	FEMELLES				
N° animaux	0909	0910	0911	0912	0913
Activité Spontanée	N	N	N	N	N
Reflexe de Preyer (bruit)	N	N	N	N	N
Effet respiratoire	N	N	N	N	N
Convulsions	0	0	0	0	0
Tremblements	0	0	0	0	0
Température	N	N	N	N	N
Tonus musculaire	N	N	N	N	N
Ptose palpébrale	N	N	N	N	N
Mydriase	N	N	N	N	N
Salivation / Larmes	N	N	N	N	N
Reflexe de Retournement	N	N	N	N	N
Piloérection	N	N	N	N	N

LEGENDE : N : Normal 0 : Absence

N° étude : T 267 / 4545 **LOT 4** **– VOIE ORALE –**

DOSE : 2500 mg/Kg de Produit

Espèce : SOURIS J1 : 26.05.94 Opérateur : M.M

– Tableau 1d –

OBSERVATIONS CLINIQUES (+ 1 h.)

	MALES				
N° animaux	0914	0915	0916	0917	0918
Activité Spontanée	N	N	N	N	N
Reflexe de Preyer (bruit)	N	N	N	N	N
Effet respiratoire	N	N	N	N	N
Convulsions	0	0	0	0	0
Tremblements	0	0	0	0	0
Température	N	N	N	N	N
Tonus musculaire	N	N	N	N	N
Ptose palpébrale	N	N	N	N	N
Mydriase	N	N	N	N	N
Salivation / Larmes	N	N	N	N	N
Reflexe de Retournement	N	N	N	N	N
Piloérection	N	N	N	N	N

	FEMELLES				
N° animaux	0919	0920	0921	0922	0923
Activité Spontanée	N	N	N	N	N
Reflexe de Preyer (bruit)	N	N	N	N	N
Effet respiratoire	N	N	N	N	N
Convulsions	0	0	0	0	0
Tremblements	0	0	0	0	0
Température	N	N	N	N	N
Tonus musculaire	N	N	N	N	N
Ptose palpébrale	N	N	N	N	N
Mydriase	N	N	N	N	N
Salivation / Larmes	N	N	N	N	N
Reflexe de Retournement	N	N	N	N	N
Piloérection	N	N	N	N	N

LEGENDE : N : Normal 0 : Absence

ALKACIDE – lot 1096

N° étude : T 267 / 4545 **LOT 1** TABLEAU : 2.m.a

J1 : 26.05.94 Espèce : SOURIS Sexe : Mâle

DOSE : 1600 mg/Kg de Produit – VOIE ORALE Opérateur : M.M

EVOLUTION PONDERALE (en g)

N° animaux	0884	0885	0886	0887	0888	Moyenne	Ecart–T.
J1	21,5	21,5	22,0	21,5	22,0	21,70	0,27
J4	25,0	23,0	26,0	27,0	25,0	25,20	1,48
J8	23,0	30,0	27,0	30,0	29,0	27,80	2,95
J15	28,0	37,0	29,0	34,5	33,0	32,30	3,77
VARIATION J15–J1	6,5	15,5	7,0	13,0	11,0	10,60	3,86

EXAMEN AUTOPSIQUE

MORTALITE	N° ax	0884	0885	0886	0887	0888	Légende
	Rang	J15	J15	J15	J15	J15	
	Cause	T	T	T	T	T	T : Sacrifice
OBSERVATIONS		R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S : Rien à signaler

AUTRES OBSERVATIONS : /

ALKACIDE – lot 1096

N° étude : T 267 / 4545 **LOT 1** TABLEAU : 2.f.a

J1 : 26.05.94 Espèce : SOURIS Sexe : Femelle

DOSE : 1600 mg/Kg de Produit – VOIE ORALE Opérateur : M.M

EVOLUTION PONDERALE (en g)

N° animaux	0889	0890	0891	0892	0893	Moyenne	Ecart-T.
J1	20,0	20,0	21,0	20,0	20,0	20,20	0,45
J4	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,00	0,00
J8	26,0	28,0	26,5	26,0	26,5	26,60	0,82
J15	27,5	29,5	28,0	28,0	28,0	28,20	0,76
VARIATION J15-J1	7,5	9,5	7,0	8,0	8,0	8,00	0,94

EXAMEN AUTOPSIQUE

MORTALITE	N° ax	0889	0890	0891	0892	0893	Légende
	Rang	J15	J15	J15	J15	J15	
	Cause	T	T	T	T	T	T : Sacrifice
OBSERVATIONS		R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S : Rien à signaler

AUTRES OBSERVATIONS : /

ALKACIDE – lot 1096

N° étude : T 267 / 4545 **LOT 2** TABLEAU : 2.m.b

J1 : 26.05.94 Espèce : SOURIS Sexe : Mâle

DOSE : 1790 mg/Kg de produit – VOIE ORALE Opérateur : M.M

EVOLUTION PONDERALE (en g)

N° animaux	0894	0895	0896	0897	0898	Moyenne	Ecart-T.
J1	19,5	20,0	20,0	20,0	21,5	20,20	0,76
J4	22,0	24,0	21,0	+	25,0	23,00	1,83
J8	28,0	30,0	27,0	+	30,0	28,75	1,50
J15	31,5	37,0	31,0	+	35,0	33,63	2,87
VARIATION J15-J1	12,0	17,0	11,0	/	13,5	13,38	2,63

EXAMEN AUTOPSIQUE

MORTALITE	N° ax	0894	0895	0896	0897	0898	Légende
	Rang	J15	J15	J15	J 2	J15	S : Spontanée
	Cause	T	T	T	S	T	T : Sacrifice
OBSERVATIONS		R.A.S	R.A.S	R.A.S	(a)	R.A.S	R.A.S : Rien à signaler

OBSERVATIONS :

(a) : ESTOMAC : météorisation, paroi fine, présence d'un liquide visqueux incolore + particules (nourriture)

ALKACIDE – lot 1096

N° étude : T 267 / 4545 **LOT 2** TABLEAU : 2.f.b

J1 : 26.05.94 Espèce : SOURIS Sexe : Femelle

DOSE : 1790 mg/Kg de produit – VOIE ORALE Opérateur : M.M

EVOLUTION PONDERALE (en g)

N° animaux	0899	0900	0901	0902	0903	Moyenne	Ecart-T.
J1	18,0	18,5	20,5	20,0	19,5	19,30	1,04
J4	+	+	+	24,0	+	24,00	–
J8	+	+	+	28,0	+	28,00	–
J15	+	+	+	30,0	+	30,00	–
VARIATION J15–J1	/	/	/	10,0	/	10,00	–

EXAMEN AUTOPSIQUE

	N° ax	0899	0900	0901	0902	0903	Légende
MORTALITE	Rang	J 2	J 2	J 2	J15	J 2	S : Spontanée
	Cause	S	S	S	T	S	T : Sacrifice
OBSERVATIONS		(a)	(a)	(a)	R.A.S	(a)	R.A.S : Rien à signaler

OBSERVATIONS :

(a) : ESTOMAC : météorisation, paroi fine, présence d'un liquide visqueux incolore + particules (nourriture)

ALKACIDE – lot 1096

N° étude : T 267 / 4545 **LOT 3** TABLEAU : 2.m.c

J1 : 26.05.94 Espèce : SOURIS Sexe : Mâle

DOSE : 2000 mg/Kg de Produit – VOIE ORALE Opérateur : M.M

EVOLUTION PONDERALE (en g)

N° animaux	0904	0905	0906	0907	0908	Moyenne	Ecart-T.
J1	20,5	18,0	18,0	20,5	18,5	19,10	1,29
J4	+	22,0	+	+	23,0	22,50	0,71
J8	+	25,0	+	+	25,5	25,25	0,35
J15	+	32,0	+	+	29,0	30,50	2,12
VARIATION J15–J1	/	14,0	/	/	10,5	12,25	2,47

EXAMEN AUTOPSIQUE

MORTALITE	N° ax	0904	0905	0906	0907	0908	Légende
	Rang	J 2	J15	J 2	J 2	J15	S : Spontanée
	Cause	S	T	S	S	T	T : Sacrifice
OBSERVATIONS		(a)	R.A.S	(a)	(a)	R.A.S	R.A.S : Rien à signaler

OBSERVATIONS :

(a) : ESTOMAC : météorisation, paroi fine, présence d'un liquide visqueux incolore + particules (nourriture)

ALKACIDE – lot 1096

N° étude : T 267 / 4545 **LOT 3** TABLEAU : 2.f.c

J1 : 26.05.94 Espèce : SOURIS Sexe : Femelle

DOSE : 2000 mg/Kg de Produit – VOIE ORALE Opérateur : M.M

EVOLUTION PONDERALE (en g)

N° animaux	0909	0910	0911	0912	0913	Moyenne	Ecart-T.
J1	20,5	19,5	20,0	19,5	19,5	19,80	0,45
J4	+	22,0	+	+	+	–	–
J8	+	25,5	+	+	+	–	–
J15	+	26,5	+	+	+	–	–
VARIATION J15–J1	/	7,0	/	/	/	7,00	–

EXAMEN AUTOPSIQUE

	N° ax	0909	0910	0911	0912	0913	Légende
MORTALITE	Rang	J 4	J 15	J 2	J 2	J 2	S : Spontanée
	Cause	S	T	S	S	S	T : Sacrifice
OBSERVATIONS		(b)	R.A.S	(a)	(a)	(a)	R.A.S : Rien à signaler

OBSERVATIONS :

(a) : ESTOMAC : météorisation, paroi fine, présence d'un liquide visqueux incolore + particules (nourriture)

(b) : (a) + DUODENUM : paroi hémorragique – JEJUNUM–ILEON : presque vides

ALKACIDE – lot 1096

N° étude : T 267 / 4545 **LOT 4** TABLEAU : 2.m.d

J1 : 26.05.94 Espèce : SOURIS Sexe : Mâle

DOSE : 2500 mg/Kg de Produit – VOIE ORALE Opérateur : M.M

EVOLUTION PONDERALE (en g)

N° animaux	0914	0915	0916	0917	0918	Moyenne	Ecart-T.
J1	20,0	18,0	18,0	20,5	18,5	19,00	1,17
J4	+	+	+	26,0	+		
J8	+	+	+	32,0	+		
J15	+	+	+	35,5	+		
VARIATION J15–J1	/	/	/	15,0	/	15,00	–

EXAMEN AUTOPSIQUE

MORTALITE	N° ax	0914	0915	0916	0917	0918	Légende
	Rang	J 2	J 2	J 2	J 15	J 2	S : Spontanée
	Cause	S	S	S	T	S	T : Sacrifice
OBSERVATIONS		(a)	(a)	(a)	R.A.S	(a)	R.A.S : Rien à signaler

OBSERVATIONS :

(a) : ESTOMAC : Paroi très fine, présence d'un liquide visqueux incolore
+ reste de nourriture

ALKACIDE – lot 1096

N° étude : T 267 / 4545 **LOT 4** TABLEAU : 2.f.d

J1 : 26.05.94 Espèce : SOURIS Sexe : Femelle

DOSE : 2500 mg/Kg de Produit – VOIE ORALE Opérateur : M.M

EVOLUTION PONDERALE (en g)

N° animaux	0919	0920	0921	0922	0923	Moyenne	Ecart-T.
J1	19,5	18,0	19,0	18,5	18,0	18,60	0,65
J4	+	+	+	+	+	–	–
J8	+	+	+	+	+	–	–
J15	+	+	+	+	+	–	–
VARIATION J15–J1	/	/	/	/	/	–	–

EXAMEN AUTOPSIQUE

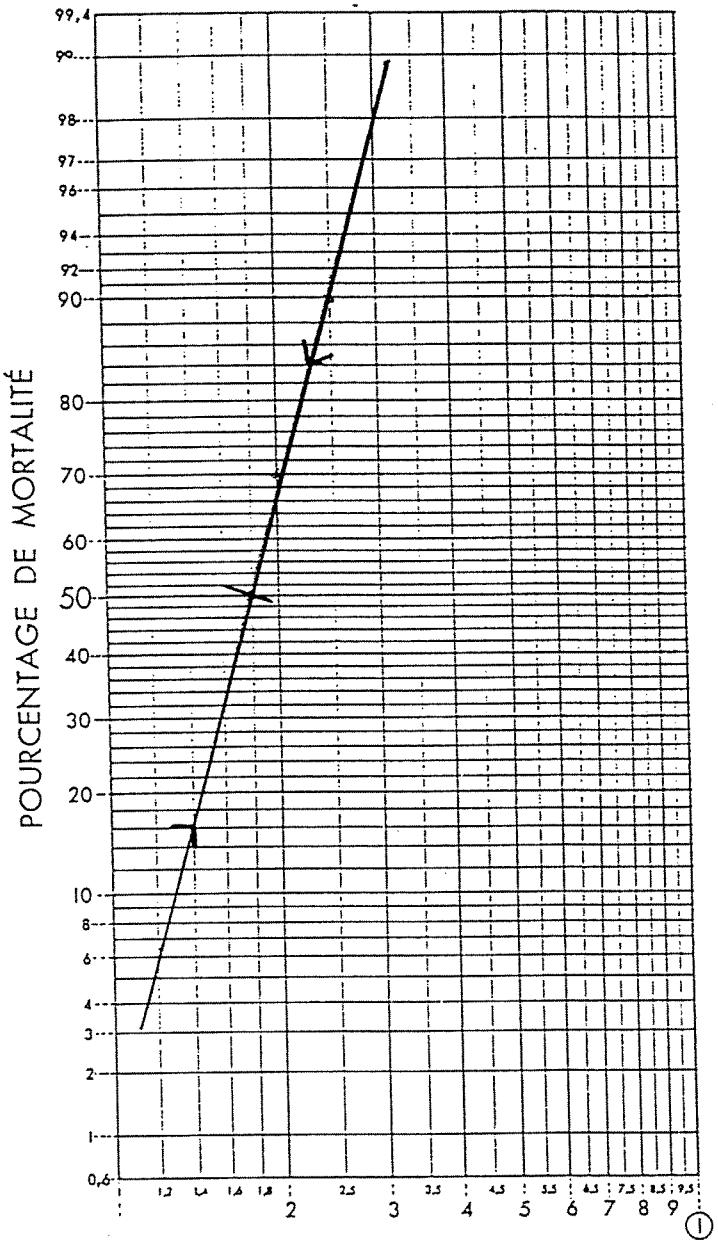
	N° ax	0919	0920	0921	0922	0923	Légende
MORTALITE	Rang	J 2	J 2	J 2	J 2	J 2	S : Spontanée
	Cause	S	S	S	S	S	T : Sacrifice
OBSERVATIONS		(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	R.A.S : Rien à signaler

OBSERVATIONS :

(a) : ESTOMAC : Paroi très fine, présence d'un liquide visqueux incolore
+ reste de nourriture

TABLEAU 3

DL50 par voie orale



doses en mg/kg (1000)

EVIC-CEBA
LABORATOIRE DE RECHERCHE ET D'EXPERIMENTATION

RAPPORT D'ETUDE : T 268/4545 du 2 Août 1994

ALKAPHARM

Toxicité orale aiguë chez la Souris
de la préparation

Alkacide – Lot 1096 à 5 %
dans l'eau distillée

(Epreuve limite)

BG/CP

Ce rapport contient 8 pages

Z.I. - 33295 BLANQUEFORT - FRANCE
TÉLEX 550 717 - FAX 56 95 05 22
TÉL. 56 35 02 25

1, rue Massue - 94300 VINCENNES - FRANCE
FAX (1) 48 08 62 31
TÉL. (1) 43 65 03 03

S.A. AU CAPITAL DE 2 400 000 FRS - RC 70B70 BORDEAUX - SIRET 470 200 700 00016 - FR 79470200700

EVIC-TOX DIVISION EXPERIMENTATION ANIMALE
EVIC-DOC DIVISION BIBLIOGRAPHIQUE
EVIC-BIO DIVISION BIOTECHNIQUE
EVIC-IDEC DIVISION EXPLORATION CLINIQU

Laboratoire accrédité par le
Réseau National d'Essais sous le
n° 29.85/01

Toxicité orale aiguë chez la Souris de la préparation

Alkacide – Lot 1096 à 5 % dans l'eau distillée

(Epreuve limite)

Référence de l'étude	: T 268/4545
Protocole utilisé	: ligne directrice 401 de l'OCDE
Produit étudié	: Alkacide – Lot 1096 à 5 % dans l'eau distillée
Commanditaire	: ALKAPHARM
Moniteur de l'étude	: S. MERCIER
Lieu de réalisation de l'étude	: EVIC CEBA – 33295 BLANQUEFORT
Technicien responsable	: Martine MIERMON 26/08/94
Directeur de l'étude	: Philippe DUFOUR 22/08/94
Assurance Qualité	: Patrick GOMOND 22.08.94
Directeur du Laboratoire d'Essai	: Philippe MASSON
Dates d'essai	
Début d'étude	: 8 Juin 1994
Fin d'étude	: 22 Juin 1994

RESULTAT ET CONCLUSION

La préparation **Alkacide – Lot 1096 à 5 % dans l'eau distillée** administrée par voie orale chez la Souris mâle et femelle à la dose maximale unique de 20 ml/kg (ou 20 000 mg/kg) :

- n'entraîne aucune mortalité,
- n'a pas d'effet toxique sur le comportement et les fonctions végétatives des animaux,
- ne modifie pas leur croissance pondérale,
- ne provoque pas d'altérations organiques ou tissulaires visibles macroscopiquement.

Dans les conditions expérimentales adoptées, la DL0 par voie orale de la préparation étudiée est supérieure à 20 ml/kg chez la Souris.

Selon la directive 67/548/CEE, la préparation testée doit être classée parmi les substances **non dangereuses** en cas d'ingestion.

Le rapport d'étude ne concerne que l'objet soumis à l'essai.

1. INTRODUCTION

. But de l'étude

Evaluer les propriétés toxiques d'une substance ou d'une préparation administrée par voie orale chez la Souris en une dose unique.

. Protocole utilisé

L'essai est réalisé selon la ligne directrice 401 de l'OCDE.

2. PRODUIT ETUDIE

- Dénomination, référence : Alkacide – Lot 1096
- Aspect : liquide bleu
- Quantité reçue, conditionnement : 250 g, flacon en plastique
- Date de réception : 10 Mai 1994
- Numéro d'enregistrement au Laboratoire : 4545
- Fiche de renseignement : non communiquée
- Contrôle de l'homogénéité : non exigé pour les études inférieures à 28 jours
- Stockage : à température ambiante, à l'abri de la lumière
- Archivage : échantillon de produit conservé pendant 10 ans. Le rapport final et les données brutes de l'essai sont archivés dans la salle réservée à cet effet, dans le Laboratoire d'Essai.
- Préparation testée : Alkacide en solution à 5 % dans l'eau distillée
- Véhicule utilisé : eau distillée (Méram Lot 43209)

3. MODE OPERATOIRE

. Système réactif

- Espèce, souche, origine : Souris NMRI Han EOPS, animalerie de production EVIC-CEBA (33295 – BLANQUEFORT, France).
- Nombre, sexe : 10, 5 mâles et 5 femelles
- Age, poids : 5 semaines environ, entre 19 et 22 g

- Stabulation, nourriture : 5 par sexe et par cage en polypropylène de dimension 46,5 x 15 x 14 cm. Maintenance environnementale conforme aux exigences de la directive 86/609/CEE. Aliment granulé UAR A04-10 (91360 - EPINAY SUR ORGE, FRANCE).

. Conditions d'utilisation du produit

Les animaux sont mis à jeun 4 heures avant le traitement. Ils reçoivent par gavage, en fonction de leur poids, le produit à tester dilué à 5 % dans l'eau distillée à la dose unique de 20 ml/kg (ou 20 000 mg/kg). La préparation est maintenue sous agitation magnétique pendant les traitements.

. Raison du choix de la voie d'administration

Le traitement par voie orale est la méthode de choix pour estimer les effets défavorables résultant d'une ingestion accidentelle chez l'Homme.

. Observations

Les animaux sont gardés en observation 14 jours après le traitement.

Examens cliniques

- une observation clinique est pratiquée au moins une fois par jour afin de noter les modifications de l'aspect, du comportement et des fonctions végétatives des animaux traités. Une observation clinique individuelle est réalisée 1 heure après le traitement (tableau 1). Ces examens sont poursuivis au cours des 5 heures suivantes, puis quotidiennement jusqu'à la fin de l'essai.

- le poids corporel de chaque animal est déterminé immédiatement avant le traitement (J1) puis 3, 7 et 14 jours après l'administration de la substance à tester.

Examens autopsiques

A la fin de la période d'observation, tous les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale puis autopsiés. Toutes les altérations pathologiques macroscopiques sont enregistrées.
Aucun prélèvement tissulaire n'est effectué.

. Interprétation des résultats

Conformément à la directive 67/548/CEE, la préparation testée n'appartient pas à la classe des substances dangereuses par ingestion si la DL50 est supérieure à 2000 mg/kg.

4. RESULTATS ET CONCLUSION

Examens cliniques

. Observations cliniques

Aucune mortalité n'a été constatée.
Aucune modification de l'aspect, du comportement et des fonctions végétatives n'a été observée chez tous les animaux 1 heure après le traitement (tableau 1) puis au cours des 5 heures suivantes. Les examens quotidiens renouvelés pendant la période d'observation n'ont permis de noter aucune altération de l'état général et du comportement des animaux.

. Evolution pondérale (tableaux 2.m et 2.f)

L'évolution pondérale individuelle de tous les animaux mâles et femelles a été normale et régulière. Le gain pondéral moyen après 14 jours d'observation est apparu nettement positif et satisfaisant pour cette espèce.

Examens autopsiques (tableaux 2.m et 2.f)

L'autopsie de tous les animaux, 14 jours après le traitement n'a mis en évidence aucune lésion organique ou tissulaire.

Dans les conditions expérimentales adoptées, la DL0 par voie orale de la préparation **Alkacide – Lot 1096 à 5 % dans l'eau distillée** chez la Souris mâle et femelle est **supérieure** à 20 ml/kg.

L'interprétation des résultats faite selon la directive 67/548/CEE permet de classer la préparation testée parmi les substances **non dangereuses** en cas d'ingestion.

ALKACIDE – lot 1096

N° étude : T 268 / 4545
J1 : 08.06.94
Administration : VOIE ORALE
DOSE : 20 ml/Kg de Produit dilué à 5%

Espèce : SOURIS
Sexe : Mâle et Femelle

Opérateur : M.M

OBSERVATIONS CLINIQUES

	MALES				
N° animaux	1105	1106	1107	1108	1109
Activité Spontanée	N	N	N	N	N
Reflexe de Preyer (bruit)	N	N	N	N	N
Effet respiratoire	N	N	N	N	N
Convulsions	0	0	0	0	0
Tremblements	0	0	0	0	0
Température	N	N	N	N	N
Tonus musculaire	N	N	N	N	N
Ptose palpébrale	N	N	N	N	N
Mydriase	N	N	N	N	N
Salivation / Larmes	N	N	N	N	N
Reflexe de Retournement	N	N	N	N	N
Piloérection	N	N	N	N	N

	FEMELLES				
N° animaux	1110	1111	1112	1113	1114
Activité Spontanée	N	N	N	N	N
Reflexe de Preyer (bruit)	N	N	N	N	N
Effet respiratoire	N	N	N	N	N
Convulsions	0	0	0	0	0
Tremblements	0	0	0	0	0
Température	N	N	N	N	N
Tonus musculaire	N	N	N	N	N
Ptose palpébrale	N	N	N	N	N
Mydriase	N	N	N	N	N
Salivation / Larmes	N	N	N	N	N
Reflexe de Retournement	N	N	N	N	N
Piloérection	N	N	N	N	N

LEGENDE : N : Normal 0 : Absence

Tableau 1

ALKACIDE – lot 1096

N° étude : T 268 / 4545 TABLEAU : 2.m

J1 : 08.06.94 Espèce : SOURIS Sexe : Mâle

Administration : VOIE ORALE
DOSE : 20 ml/Kg de Produit dilué à 5% Opérateur : M.M

EVOLUTION PONDERALE (en g)

N° animaux	1105	1106	1107	1108	1109	Moyenne	Ecart-T.
J1	22,0	21,0	20,0	21,0	20,0	20,8	0,8
J4	25,5	24,0	23,5	25,5	25,0	24,7	0,9
J8	29,0	28,5	27,5	29,0	30,0	28,8	0,9
J15	34,0	33,5	32,5	34,5	35,0	33,9	1,0
VARIATION J15-J1	12,0	12,5	12,5	13,5	15,0	13,1	1,2

EXAMEN AUTOPSIQUE

MORTALITE	N° ax	1105	1106	1107	1108	1109	Légende
	Rang	J15	J15	J15	J15	J15	
	Cause	T	T	T	T	T	T : Sacrifice
OBSERVATIONS		R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S : Rien à signaler

AUTRES OBSERVATIONS : /

ALKACIDE – lot 1096

N° étude : T 268 / 4545 TABLEAU : 2.f

J1 : 08.06.94 Espèce : SOURIS Sexe : Femelle

Administration : VOIE ORALE
DOSE : 20 ml/Kg de Produit dilué à 5% Opérateur : M.M

EVOLUTION PONDERALE (en g)

N° animaux	1110	1111	1112	1113	1114	Moyenne	Ecart-T.
J1	19,0	20,0	20,5	20,0	20,5	20,0	0,6
J4	20,5	21,5	21,5	21,0	22,0	21,3	0,6
J8	24,0	23,5	24,0	25,5	26,0	24,6	1,1
J15	28,0	27,5	28,0	27,5	29,0	28,0	0,6
VARIATION J15-J1	9,0	7,5	7,5	7,5	8,5	8,0	0,7

EXAMEN AUTOPSIQUE

	N° ax	1110	1111	1112	1113	1114	Légende
MORTALITE	Rang	J15	J15	J15	J15	J15	
	Cause	T	T	T	T	T	T : Sacrifice
OBSERVATIONS		R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S : Rien à signaler

AUTRES OBSERVATIONS : /

EVIC-CEBA
LABORATOIRE DE RECHERCHE ET D'EXPERIMENTATION

RAPPORT D'ETUDE : T 303/5089 du 2 Août 1994

ALKAPHARM

Evaluation de l'effet irritant/corrosif
aigu sur la peau du produit

Alkacide désinfectant – lot 0597

BG/CP

Ce rapport contient 10 pages

Z.I. - 33295 BLANQUEFORT - FRANCE
TÉLEX 550 717 - FAX 56 95 05 22
TÉL. 56 35 02 25

1, rue Massue - 94300 VINCENNES - FRANCE
FAX (1) 48 08 62 31
TÉL. (1) 43 65 03 03

S.A. AU CAPITAL DE 2 400 000 FRS - RC 70B70 BORDEAUX - SIRET 470 200 700 00016 - FR 79470200700

Laboratoire accrédité par le
Réseau National d'Essais sous le
n° 29.85/01

Evaluation de l'effet irritant/corrosif aigu sur la peau du produit

Alkacide désinfectant – lot 0597 utilisé tel quel

Référence de l'étude	: T 303/5089
Protocole utilisé	: ligne directrice 404 de l'OCDE
Produit étudié	: Alkacide désinfectant – lot 0597 utilisé tel quel
Commanditaire	: ALKAPHARM
Moniteur de l'étude	: N. SALKIND
Lieu de réalisation de l'étude	: EVIC CEBA – 33295 BLANQUEFORT
Technicien responsable	: Florence PROD'HOMME 19/08/94
Directeur de l'étude	: Philippe DUFOUR 19/08/94
Assurance Qualité	: Patrick GOMOND 19.08.94
Directeur du Laboratoire d'Essai	: Philippe MASSON
Dates d'essai	
Début d'étude	: 7 Juin 1994
Fin d'étude	: 20 Juin 1994

RESULTATS ET CONCLUSION

L'application de 0,5 ml du produit **Alkacide désinfectant – lot 0597** tel quel sur la peau tondue de 3 lapins sous pansement semi-occlusif pendant 4 heures provoque des lésions tissulaires à type de brûlure.

Selon la directive Européenne 67/548 CEE, le produit étudié est **corrosif** pour la peau. Il provoque des brûlures.

Le rapport d'étude ne concerne que l'objet soumis à l'essai.

1. INTRODUCTION

. But de l'étude

Déterminer sur la peau du lapin l'effet irritant/corrosif d'une substance afin d'extrapoler ses propriétés irritantes à l'être humain.

. Protocole utilisé

L'essai est réalisé selon la ligne directrice 404 de l'OCDE.

2. PRODUIT ETUDIE

- Dénomination, référence : Alkacide désinfectant – lot 0597
- Aspect : liquide bleuté
- Quantité reçue, conditionnement : 250 ml, flacon en plastique
- Date de réception : 3 Juin 1994
- Numéro d'enregistrement au Laboratoire : 5089
- Fiche d'informations : non communiquée
- Contrôle de l'homogénéité : non exigé pour les études inférieures à 28 jours
- Stockage : à température ambiante, à l'abri de la lumière et de la chaleur
- Archivage : échantillon du produit conservé pendant 10 ans. Le rapport final et les données brutes de l'essai sont archivés dans la salle réservée à cet effet, dans le Laboratoire d'essai.
- Valeur du pH = 5.6

3. MODE OPERATOIRE

. Système réactif

- Espèce, souche, origine : lapin albinos, Néo-zélandais, élevage COB.LABO.LAP. (22120 – YFFINIAC, FRANCE).
- Raison du choix de l'espèce : le lapin albinos est l'espèce recommandée pour ce type d'étude, car dans la plupart des cas, il est plus sensible que l'Homme aux agents irritants ou corrosifs cutanés.

- Nombre, sexe : 3 mâles
  Si des effets prononcés sur la peau sont prévisibles, l'essai est réalisé sur un animal. En fonction des résultats, l'étude peut ne pas être continuée avec les 2 autres animaux.

- Poids moyen : 2,6 kg

- Identification : bague auriculaire

- Acclimatation : au moins 5 jours

- Stabulation, nourriture : conditions de stabulation conformes aux exigences de la directive 86/609/CEE (en cage individuelle sur grille). Aliment granulé Energie U326, COFNA (37000 – TOURS, FRANCE).

. Conditions d'utilisation du produit

Environ 24 heures avant l'épreuve, la fourrure de la région dorsale du tronc des animaux est tondue avec précaution en évitant d'érafler la peau. Seuls, les animaux présentant une peau saine et intacte sont retenus pour l'essai ;

Le produit testé est appliqué tel quel sous pansement semi-occlusif sur la peau des 3 lapins à la dose de 0,5 ml/lapin selon le protocole suivant :

. 0,5 ml de produit sont déposés sur la compresse de gaze maintenue en contact avec la peau au moyen d'un ruban adhésif "Micropore" de 5 x 5 cm. Puis, le tronc de l'animal est entouré avec une bande extensible de 10 cm de large (type bande à varice) fixée par une bande adhésive. La bande est placée de manière à ne pas gêner les mouvements respiratoires.

. Les lapins sont remis dans leur cage pendant 4 heures au terme desquelles le pansement et le carré de gaze sont enlevés. La substance résiduelle est éliminée à l'aide d'un papier absorbant imbibé d'eau distillée ou du véhicule approprié.

. On applique ensuite pendant 3 minutes sur une zone de peau indemne dans les mêmes conditions expérimentales 0,5 ml de produit sous pansement semi-occlusif.

. Examens cliniques et notations

L'observation des symptômes d'érythème et d'oedème cutanés est effectuée à l'oeil nu 1, 24, 48 et 72 heures après l'enlèvement de la compresse. Elle peut être prolongée 14 jours au maximum si la réversibilité n'est pas totalement établie au bout de 72 heures. Les réactions d'irritation (érythème, oedème) sont notées et enregistrées d'après l'échelle ci-dessous :

Formation d'érythème et d'escarre

- Pas d'érythème	0
- Erythème très léger (à peine perceptible)	1
- Erythème bien défini	2
- Erythème modéré à grave	3
- Erythème grave (couleur rouge violacée) à escarre léger (lésions en profondeur)	4

Formation d'un oedème

- Pas d'oedème	0
- Oedème très léger (à peine perceptible)	1
- Oedème léger (pourtour de la zone oedémateuse bien défini par un gonflement net)	2
- Oedème modéré (gonflement d'1 mm)	3
- Oedème grave (gonflement de plus d'1 mm s'étendant au-delà de la région exposée)	4

Outre les observations concernant l'irritation, toute lésion grave et tout autre effet toxique font l'objet d'une description complète.

. Interprétation des résultats

Compte tenu des résultats et selon la directive 67/548/CEE, la substance ou préparation testée est considérée comme irritante ou corrosive pour la peau dans les cas suivants :

Une substance ou préparation est considérée comme **irritante pour la peau** lorsque son application sous pansement semi-occlusif pendant 4 heures provoque une inflammation importante de la peau caractérisée par la formation d'érythème et d'escarre ou la formation d'oedème équivalant à une valeur moyenne égale ou supérieure à 2, calculée pour chaque animal chez deux animaux au moins.

Ces réactions doivent persister 24 heures au moins après la fin de la période d'exposition.
Toutes les lectures faites 24 h, 48 h et 72 h après l'enlèvement des pansements sont prises en compte pour calculer les valeurs moyennes respectives.
L'inflammation de la peau est également importante, si elle persiste sur au moins deux animaux à la fin de la période d'observation (directive 93/21/CEE).

Une substance ou préparation est considérée comme **corrosive pour la peau** lorsque son application sur la peau saine et intacte produit des destructions tissulaires sur toute la profondeur de la peau chez un animal au moins.

Il y a risque de graves brûlures lorsque les lésions tissulaires apparaissent après un temps d'exposition ne dépassant pas 3 minutes.
Il y a risque de brûlure lorsque ces lésions apparaissent après un temps d'exposition ne dépassant pas quatre heures.

4. RESULTATS ET CONCLUSION

Les réactions d'irritation constatées chez chaque animal au moment de chaque observation sont rapportées dans les tableaux ci-après.

. Application pendant 4 heures (tableaux 1 et 2)

Dans les conditions expérimentales adoptées, l'application du produit testé sur la peau du lapin pendant 4 heures provoque chez les 3 animaux l'apparition d'une importante réaction d'irritation (érythème bien défini et oedème modéré) et des lésions à type de brûlure.
Ces réactions s'aggravent le jour suivant : érythème et oedème graves, destruction tissulaire sur toute la profondeur de la peau, épaississement cutané important et peau rugueuse.
Après environ 1 semaine la peau a un aspect cartonné (croûte) qui tend à se craqueler (J9) puis à se décoller (J14).
La peau est toujours irritée au pourtour de la brûlure, la réversibilité des lésions n'est pas obtenue en fin d'essai.

. Application pendant 3 minutes (tableau 3)

Dans les conditions expérimentales adoptées, l'application du produit testé sur la peau du lapin pendant 3 minutes provoque l'apparition chez les 3 animaux d'une légère réaction d'irritation (érythème très léger) réversible 48 heures plus tard.

L'interprétation des résultats faite selon la Directive 67/548/CEE permet de classer le produit **Alkacide désinfectant - lot 0597** tel quel parmi les substances **corrosives** pour la peau avec risque de brûlure.

OCDE 404

EVALUATION DE L'EFFET IRRITANT / CORROSIF AIGU SUR LA PEAU DU LAPIN

Produit : ALKACIDE DESINFECTANT – lot 0597

N° étude : T 303 / 5089 Patchage 4 heures

Mode d'application : 0.5 ml de produit non dilué par pansement semi-occlusif
Début d'essai : 7.06.94

ERYTHEME

Peau Normale

N° ax	1 heure	24 heures	48 heures	72 heures	Moyenne	J5	J6
3375	2	3	3	2	**2,7**	2	2
3376	2	3	3	3	**3,0**	3	3
3377	2	3	3	3	**3,0**	3	3

OEDEME

Peau Normale

N° ax	1 heure	24 heures	48 heures	72 heures	Moyenne	J5	J6
3375	3	4	3	3	**3,3**	3	3
3376	3	4	3	3	**3,3**	3	3
3377	3	4	4	4	**4,0**	4	4

OCDE 404

EVALUATION DE L'EFFET IRRITANT / CORROSIF AIGU SUR LA PEAU DU LAPIN

Produit : ALKACIDE DESINFECTANT – lot 0597

N° étude : T 303 / 5089 Patchage 4 heures

Mode d'application : 0.5 ml de produit non dilué par pansement semi-occlusif
Début d'essai : 7.06.94

ERYTHEME

Peau Normale

N° ax	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14
3375	2	2	2	2	2	2	2	2
3376	3	3	3	2	2	2	2	2
3377	3	2	2	2	2	2	2	2

OEDEME

Peau Normale

N° ax	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14
3375	3	3	3	3	3	3	3	3
3376	3	3	3	3	3	3	3	2
3377	4	3	3	3	3	3	3	2

OCDE 404

EVALUATION DE L'EFFET IRRITANT / CORROSIF AIGU SUR LA PEAU DU LAPIN

Produit : ALKACIDE DESINFECTANT – lot 0597

N° étude : T 303 / 5089 Patchage 3 minutes

Mode d'application : 0.5 ml de produit non dilué par pansement semi-occlusif
Début d'essai : 7.06.94

ERYTHEME
Peau Normale

N° ax	1 heure	24 heures	48 heures	72 heures	Moyenne	J5	J6
3375	1	1	0	0	**0,3**	0	0
3376	1	0	0	0	**0,0**	0	0
3377	1	1	0	0	**0,3**	0	0

OEDEME
Peau Normale

N° ax	1 heure	24 heures	48 heures	72 heures	Moyenne	J5	J6
3375	0	0	0	0	**0,0**	0	0
3376	0	0	0	0	**0,0**	0	0
3377	0	0	0	0	**0,0**	0	0

OCDE 404

EVALUATION DE L'EFFET IRRITANT / CORROSIF AIGU SUR LA PEAU DU LAPIN

Produit : ALKACIDE DESINFECTANT – lot 0597

N° étude : T 303 / 5089

Patchage 3 minutes

Mode d'application : 0.5 ml de produit non dilué par pansement semi-occlusif
Début d'essai : 7.06.94

ERYTHEME

Peau Normale

N° ax	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14
3375	0	0	0	0	0	0	0	0
3376	0	0	0	0	0	0	0	0
3377	0	0	0	0	0	0	0	0

OEDEME

Peau Normale

N° ax	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14
3375	0	0	0	0	0	0	0	0
3376	0	0	0	0	0	0	0	0
3377	0	0	0	0	0	0	0	0

EVIC-CEBA
LABORATOIRE DE RECHERCHE ET D'EXPERIMENTATION

RAPPORT D'ETUDE : T 307/5089 du 2 Août 1994

ALKAPHARM

Evaluation de l'effet irritant/corrosif
aigu sur la peau de la préparation

Alkacide désinfectant – lot 0597
à 5 % dans l'eau distillée

BG/CP

Ce rapport contient 8 pages

Z.I. - 33295 BLANQUEFORT - FRANCE
TÉLEX 550 717 - FAX 56 95 05 22
TÉL. 56 35 02 25

1, rue Massue - 94300 VINCENNES - FRANCE
FAX (1) 48 08 62 31
TÉL. (1) 43 65 03 03

S.A. AU CAPITAL DE 2 400 000 FRS - RC 70B70 BORDEAUX - SIRET 470 200 700 00016 - FR 79470200700

EVIC-TOX DIVISION EXPERIMENTATION ANIMALE
EVIC-DOC DIVISION BIBLIOGRAPHIQUE
EVIC-BIO DIVISION BIOTECHNIQUE
EVIC-IDEC DIVISION EXPLORATION CLINIQUE

Laboratoire accrédité par le
Réseau National d'Essais sous le
n° 29.85/01

Evaluation de l'effet irritant/corrosif
aigu sur la peau de la préparation

Alkacide désinfectant – lot 0597 à 5 % dans l'eau distillée

Référence de l'étude	: T 307/5089
Protocole utilisé	: ligne directrice 404 de l'OCDE
Produit étudié	: Alkacide désinfectant – lot 0597 dilué à 5 % dans l'eau distillée
Commanditaire	: ALKAPHARM
Moniteur de l'étude	: N. SALKIND
Lieu de réalisation de l'étude	: EVIC CEBA – 33295 BLANQUEFORT
Technicien responsable	: Florence PROD'HOMME
Directeur de l'étude	: Philippe DUFOUR
Assurance Qualité	: Patrick GOMOND
Directeur du Laboratoire d'Essai	: Philippe MASSON
Dates d'essai	
Début d'étude	: 14 Juin 1994
Fin d'étude	: 17 Juin 1994

13/08/94
18/08/94
19.08.94

RESULTATS ET CONCLUSION

L'application de 0,5 ml de la préparation **Alkacide désinfectant – lot 0597** à 5 % dans l'eau distillée sur la peau tondue de 3 lapins sous pansement semi-occlusif pendant 4 heures provoque une discrète réaction d'irritation cutanée (érythème très léger) réversible en moins de 48 heures.

Selon la directive Européenne 67/548 CEE, la préparation étudiée est classée comme **non irritante** pour la peau.

Le rapport d'étude ne concerne que l'objet soumis à l'essai.

1. INTRODUCTION

. But de l'étude

Déterminer sur la peau du lapin l'effet irritant/corrosif d'une substance afin d'extrapoler ses propriétés irritantes à l'être humain.

. Protocole utilisé

L'essai est réalisé selon la ligne directrice 404 de l'OCDE.

2. PRODUIT ETUDIE

- Dénomination, référence : Alkacide désinfectant – lot 0597
- Aspect : liquide bleuté
- Quantité reçue, conditionnement : 250 ml, flacon en plastique
- Date de réception : 3 Juin 1994
- Numéro d'enregistrement au Laboratoire : 5089
- Fiche d'informations : non communiquée
- Contrôle de l'homogénéité : non exigé pour les études inférieures à 28 jours
- Stockage : à température ambiante, à l'abri de la lumière et de la chaleur
- Archivage : échantillon du produit conservé pendant 10 ans. Le rapport final et les données brutes de l'essai sont archivés dans la salle réservée à cet effet, dans le Laboratoire d'essai.
- Valeur du pH = 6.7 (produit dilué à 5 %)

3. MODE OPERATOIRE

. Système réactif

- Espèce, souche, origine : lapin albinos, Néo-zélandais, élevage COB.LABO.LAP. (22120 – YFFINIAC, FRANCE).
- Raison du choix de l'espèce : le lapin albinos est l'espèce recommandée pour ce type d'étude, car dans la plupart des cas, il est plus sensible que l'Homme aux agents irritants ou corrosifs cutanés.

- Nombre, sexe : 3 mâles
  Si des effets prononcés sur la peau sont prévisibles, l'essai est réalisé sur un animal. En fonction des résultats, l'étude peut ne pas être continuée avec les 2 autres animaux.

- Poids moyen : 2,9 kg

- Identification : bague auriculaire

- Acclimatation : au moins 5 jours

- Stabulation, nourriture : conditions de stabulation conformes aux exigences de la directive 86/609/CEE (en cage individuelle sur grille). Aliment granulé Energie U326, COFNA (37000 – TOURS, FRANCE).

. Conditions d'utilisation du produit

Environ 24 heures avant l'épreuve, la fourrure de la région dorsale du tronc des animaux est tondue avec précaution en évitant d'érafler la peau. Seuls, les animaux présentant une peau saine et intacte sont retenus pour l'essai ;

Le produit testé est appliqué dilué à 5 % dans l'eau distillée sous pansement semi-occlusif sur la peau des 3 lapins à la dose de 0,5 ml/lapin selon le protocole suivant :

. 0,5 ml de solution sont déposés sur la compresse de gaze maintenue en contact avec la peau au moyen d'un ruban adhésif "Micropore" de 5 x 5 cm. Puis, le tronc de l'animal est entouré avec une bande extensible de 10 cm de large (type bande à varice) fixée par une bande adhésive. La bande est placée de manière à ne pas gêner les mouvements respiratoires.

. Les lapins sont remis dans leur cage pendant 4 heures au terme desquelles le pansement et le carré de gaze sont enlevés. La substance résiduelle est éliminée à l'aide d'un papier absorbant imbibé d'eau distillée ou du véhicule approprié.

. On applique ensuite pendant 3 minutes sur une zone de peau indemne dans les mêmes conditions expérimentales 0,5 ml de la préparation à 5 % sous pansement semi-occlusif.

. Examens cliniques et notations

L'observation des symptômes d'érythème et d'oedème cutanés est effectuée à l'oeil nu 1, 24, 48 et 72 heures après l'enlèvement de la compresse. Elle peut être prolongée 14 jours au maximum si la réversibilité n'est pas totalement établie au bout de 72 heures. Les réactions d'irritation (érythème, oedème) sont notées et enregistrées d'après l'échelle ci-dessous :

Formation d'érythème et d'escarre

- Pas d'érythème	0
- Erythème très léger (à peine perceptible)	1
- Erythème bien défini	2
- Erythème modéré à grave	3
- Erythème grave (couleur rouge violacée) à escarre léger (lésions en profondeur)	4

Formation d'un oedème

- Pas d'oedème	0
- Oedème très léger (à peine perceptible)	1
- Oedème léger (pourtour de la zone oedémateuse bien défini par un gonflement net)	2
- Oedème modéré (gonflement d'1 mm)	3
- Oedème grave (gonflement de plus d'1 mm s'étendant au-delà de la région exposée)	4

Outre les observations concernant l'irritation, toute lésion grave et tout autre effet toxique font l'objet d'une description complète.

. Interprétation des résultats

Compte tenu des résultats et selon la directive 67/548/CEE, la substance ou préparation testée est considérée comme irritante ou corrosive pour la peau dans les cas suivants :

Une substance ou préparation est considérée comme **irritante pour la peau** lorsque son application sous pansement semi-occlusif pendant 4 heures provoque une inflammation importante de la peau caractérisée par la formation d'érythème et d'escarre ou la formation d'oedème équivalant à une valeur moyenne égale ou supérieure à 2, calculée pour chaque animal chez deux animaux au moins.

Ces réactions doivent persister 24 heures au moins après la fin de la période d'exposition.
Toutes les lectures faites 24 h, 48 h et 72 h après l'enlèvement des pansements sont prises en compte pour calculer les valeurs moyennes respectives.
L'inflammation de la peau est également importante, si elle persiste sur au moins deux animaux à la fin de la période d'observation (directive 93/21/CEE).

Une substance ou préparation est considérée comme **corrosive pour la peau** lorsque son application sur la peau saine et intacte produit des destructions tissulaires sur toute la profondeur de la peau chez un animal au moins.

Il y a risque de graves brûlures lorsque les lésions tissulaires apparaissent après un temps d'exposition ne dépassant pas 3 minutes.
Il y a risque de brûlure lorsque ces lésions apparaissent après un temps d'exposition ne dépassant pas quatre heures.

4. RESULTATS ET CONCLUSION

Les réactions d'irritation constatées chez chaque animal au moment de chaque observation sont rapportées dans les tableaux ci-après.

. Application pendant 4 heures (tableau 1)

Dans les conditions expérimentales adoptées, l'application du produit Alkacide désinfectant - lot 0597 dilué à 5 % dans l'eau distillée, sur la peau du lapin pendant 4 heures provoque chez les 3 animaux l'apparition d'un érythème très léger totalement réversible 48 heures plus tard.

. Application pendant 3 minutes (tableau 2)

Dans les conditions expérimentales adoptées, l'application du produit Alkacide désinfectant - lot 0597 dilué à 5 % dans l'eau distillée, sur la peau du lapin pendant 3 minutes ne provoque aucune réaction d'irritation.

L'interprétation des résultats faite selon la Directive 67/548/CEE permet de classer la préparation **Alkacide désinfectant - lot 0597** à 5 % dans l'eau distillée parmi les substances **non irritantes** pour la peau.

OCDE 404

EVALUATION DE L'EFFET IRRITANT / CORROSIF AIGU SUR LA PEAU DU LAPIN

Produit : ALKACIDE DESINFECTANT – lot 0597

N° étude : T 307 / 5089 Patchage 3 minutes

Mode d'application : 0.5 ml de produit dilué à 5% par pansement semi-occlusif
Début d'essai : 14.06.94

ERYTHEME

Peau Normale

N° ax	1 heure	24 heures	48 heures	72 heures	Moyenne
3362	0	0	0	0	**0,0**
3363	0	0	0	0	**0,0**
3364	0	0	0	0	**0,0**

OEDEME

Peau Normale

N° ax	1 heure	24 heures	48 heures	72 heures	Moyenne
3362	0	0	0	0	**0,0**
3363	0	0	0	0	**0,0**
3364	0	0	0	0	**0,0**

OCDE 404

EVALUATION DE L'EFFET IRRITANT / CORROSIF AIGU SUR LA PEAU DU LAPIN

Produit : ALKACIDE DESINFECTANT – lot 0597

N° étude : T 307 / 5089 Patchage 4 heures

Mode d'application : 0.5 ml de produit diluè à 5% par pansement semi-occlusif
Début d'essai : 14.06.94

ERYTHEME

Peau Normale

N° ax	1 heure	24 heures	48 heures	72 heures	Moyenne
3362	1	0	0	0	**0,0**
3363	1	0	0	0	**0,0**
3364	1	1	0	0	**0,3**

OEDEME

Peau Normale

N° ax	1 heure	24 heures	48 heures	72 heures	Moyenne
3362	0	0	0	0	**0,0**
3363	0	0	0	0	**0,0**
3364	0	0	0	0	**0,0**

EVIC-CEBA
LABORATOIRE DE RECHERCHE ET D'EXPERIMENTATION

RAPPORT D'ETUDE : T 304/5089 du 5 Juillet 1994

ALKAPHARM

Evaluation de l'effet irritant/corrosif
aigu sur les yeux du produit

Alkacide – lot 0597

BG/CP

Ce rapport contient 9 pages

Z.I. - 33295 BLANQUEFORT - FRANCE
TÉLEX 550 717 - FAX 56 95 05 22
TÉL. 56 35 02 25

1, rue Massue - 94300 VINCENNES - FRANCE
FAX (1) 48 08 62 31
TÉL. (1) 43 65 03 03

S.A. AU CAPITAL DE 2 400 000 FRS - RC 70B70 BORDEAUX - SIRET 470 200 700 00016 - FR 79470200700

EVIC-TOX DIVISION EXPERIMENTATION ANIMALE
EVIC-DOC DIVISION BIBLIOGRAPHIQUE
EVIC-BIO DIVISION BIOTECHNIQUE
EVIC-IDEC DIVISION EXPLORATION CLINIQUE

Laboratoire accrédité par le
Réseau National d'Essais sous le
n° 29.85/01

Evaluation de l'effet irritant/corrosif aigu sur les yeux du produit

Alkacide – lot 0597

Référence de l'étude	: T 304/5089
Protocole utilisé	: ligne directrice 405 de l'OCDE
Produit étudié	: Alkacide – lot 0597
Commanditaire	: ALKAPHARM
Moniteur de l'étude	: N. SALKIND
Lieu de réalisation de l'étude	: EVIC CEBA – 33295 BLANQUEFORT
Technicien responsable	: Florence PROD'HOMME PO 12.7.94
Directeur de l'étude	: Philippe DUFOUR 11/07/94
Assurance Qualité	: Patrick GOMOND PO 11/07/94
Directeur du Laboratoire d'Essai	: Philippe MASSON 12.07.94

Dates d'essai

Début d'étude	: 6 Juin 1994
Fin d'étude	: 13 Juin 1994

RESULTATS ET CONCLUSION

L'instillation du produit Alkacide – lot 0597 à la dose de 0,1 ml dans l'oeil d'un seul lapin provoque dans l'heure qui suit une importante irritation des conjonctives oculaires et palpébrales (rougeur diffuse, tuméfaction avec paupières à moitié fermées, larmoiement important). Ces réactions perdurent ou s'aggravent (chémosis, larmoiements) dans les 24 heures suivantes. Des lésions graves de l'iris (absence de réaction) et de la cornée (opacité totale) sont notées dans les 24 heures suivant l'instillation du produit ; elles persistent au-delà d'une semaine.

Au vu de ces résultats, l'essai n'a pas été poursuivi sur deux autres lapins.

Selon la directive Européenne 67/548/CEE le produit testé est classé comme **irritant** pour l'oeil avec risques de lésions oculaires graves.

Le rapport d'étude ne concerne que l'objet soumis à l'essai.

1. INTRODUCTION

. But de l'étude

Déterminer sur l'oeil du lapin l'effet irritant/corrosif d'une substance afin d'extrapoler ses propriétés irritantes à l'être humain.

. Protocole utilisé

L'essai est réalisé selon la ligne directrice 405 de l'OCDE.

2. PRODUIT ETUDIE

- Dénomination, référence : Alkacide – lot 0597
- Aspect : liquide bleuté
- Quantité reçue, conditionnement : 250 ml, flacon en plastique
- Date de réception : 3 Juin 1994
- Numéro d'enregistrement au Laboratoire : 5089
- Fiche d'informations : non communiquée
- Contrôle de l'homogénéité : non exigé pour les études inférieures à 28 jours
- Stockage : à température ambiante, à l'abri de la lumière et de la chaleur
- Archivage : échantillon du produit conservé pendant 10 ans. Le rapport final et les données brutes de l'essai sont archivés dans la salle réservée à cet effet, dans le Laboratoire d'Essai.
- Valeur du pH = 5,6

3. MODE OPERATOIRE

. Système réactif

- Espèce, souche, origine : lapin albinos, Néo-zélandais, élevage COB.LABO.LAP. (22120 – YFFINIAC, FRANCE).
- Raison du choix de l'espèce : le lapin albinos est l'espèce recommandée pour ce type d'étude, car dans la plupart des cas, il est plus sensible que l'Homme aux agents irritants ou corrosifs oculaires.

- Nombre, sexe : 3 mâles
  Si des effets prononcés sur l'oeil sont prévisibles, l'essai est réalisé sur un animal. En fonction des résultats, l'étude peut ne pas être continuée avec les 2 autres animaux.

- Poids moyen : 2,8 kg

- Identification : bague auriculaire

- Acclimatation : au moins 5 jours

- Stabulation, nourriture : conditions de stabulation conformes aux exigences de la directive 86/609/CEE (en cage individuelle sur grille). Aliment granulé Energie U326, COFNA (37000 – TOURS, FRANCE).

. Conditions d'utilisation du produit

Après avoir vérifié que les deux yeux de chaque animal d'expérience sont sains et sans défaut, la substance est instillée dans le cul-de-sac conjonctival de l'oeil droit à la dose de 0,1 ml ou 0,1 g si le produit est pateux ou solide.
Les paupières sont maintenues fermées pendant environ 1 seconde pour éviter la perte de substance et favoriser le contact.

L'oeil gauche, qui ne subit pas le traitement sert de témoin.

Après 1 heure de contention, les animaux sont remis dans leur cage.

Dans cet essai, le produit est utilisé tel quel à la dose de 0,1 ml par oeil.

. Examens cliniques et notations

Pour procéder à l'évaluation de l'irritation oculaire, les animaux sont immobilisés sur une table et les yeux examinés comparativement 1 h, 24 h, 48 h et 72 h après l'instillation du produit.

L'essai est arrêté si aucune irritation ne se manifeste après 72 heures. Il peut être prolongé au maximum pendant 21 jours si l'irritation oculaire est persistante ou en cas d'atteinte cornéenne. Si les lésions sont trop graves, pour éviter toute douleur inutile, l'animal est sacrifié.

Les réactions sont examinées au moyen d'une lampe loupe à lumière blanche et de Wood intégrées.

Après enregistrement des observations effectuées à la 24ème heure, l'examen des yeux est poursuivi au moyen de fluoresceine.

La cotation des irritations oculaires aux différents intervalles d'observation pour chaque lapin est effectuée selon l'échelle numérique (critères de Draize) ci-après en suivant l'ordre décrit :

Conjonctive

Chémosis (A) : paupières et/ou membrane nictitante

- Pas de tuméfaction 0
- Toute tuméfaction supérieure à la normale (y compris de la membrane nictitante) 1
- Tuméfaction évidente avec éversion partielle des paupières 2
- Tuméfaction avec paupières à peu près à moitié fermées 3
- Tuméfaction avec paupières plus qu'à moitié fermées 4

Larmoiement (B) :

- Absence de larmoiement 0
- Larmoiement léger (ne pas tenir compte des légères sécrétions existant normalement dans l'angle interne) 1
- Larmoiement avec humidification des paupières et des poils avoisinant les paupières 2
- Larmoiement avec humidification des paupières et des poils sur de larges surfaces autour de l'oeil 3

Rougeur (C) : s'applique aux conjonctives palpébrale et bulbaire, à la cornée et à l'iris

- Vaisseaux sanguins normaux 0
- Nette hyperhémie de certains vaisseaux sanguins (yeux injectés) 1
- Coloration pourpre diffuse, vaisseaux sanguins individuels difficilement discernables 2
- Coloration rouge soutenu diffuse 3

Iris (D)

- Normal 0

- Plis nettement plus profonds, congestion, tuméfaction, hyperhémie péricornéenne modérée ou conjonctives injectées, n'importe lequel de ces symptômes ou toute combinaison de plusieurs d'entre eux, l'iris continuant à réagir à la lumière (une réaction lente est positive) 1

- Absence de réaction à la lumière, hémorragie, destruction marquée (chacun de ces symptômes ou l'ensemble) 2

Cornée

Opacité (E) : degré de densité (les observations portent sur les zones les plus denses)

- Pas d'ulcération ni d'opacité 0

- Zones d'opacité (autre qu'un léger ternissement de l'éclat normal) dispersées ou diffuses, détails de l'iris nettement visibles 1

- Zone translucide aisément discernable, détails de l'iris légèrement masqués 2

- Zones nacrées, détails de l'iris complètement invisibles, dimension de la pupille à peine discernable 3

- Cornée opaque, iris non discernable à travers l'opacité 4

Surface d'opacité (F) :

- Un quart (ou moins mais non nulle) 1

- Entre le quart et la moitié 2

- Entre la moitié et les trois quarts 3

- Des trois quarts à toute la surface 4

. Interprétation des résultats

Selon la directive 67/548/CEE, la substance ou préparation testée est considérée comme **irritante pour les yeux** si elle provoque des lésions oculaires importantes qui surviennent au cours des 72 heures suivant l'instillation et persistent 24 heures au moins.

Une lésion oculaire est considérée comme importante si les valeurs moyennes des mesures pour chaque type de lésion calculées pour chaque animal d'après les observations effectuées aux lectures 24, 48 et 72 heures sont équivalentes, chez deux animaux au moins aux valeurs suivantes :

. 2 ≤ opacité cornéenne	< 3
. 1 ≤ lésion de l'iris	< 2
. rougeur de la conjonctive	≥ 2,5
. oedème de la conjonctive (chémosis)	≥ 2

Il y a risque de lésions oculaires graves lorsque ces lésions (chez 2 animaux au moins) sont équivalentes à :

. opacité cornéenne	≥ 3
. lésion de l'iris	= 2

Les lésions oculaires sont également graves lorsqu'elles persistent à la fin de la période d'observation (directive 93/21/CEE).

4. RESULTATS ET CONCLUSION

Les lésions oculaires constatées chez le premier animal au moment de chaque observation sont rapportées dans le tableau ci-après.

Une heure après l'instillation du produit testé, des réactions importantes sont notées au niveau des conjonctives : coloration rouge soutenue, tuméfaction avec paupières à moitié fermées. Elles sont accompagnées d'un larmoiement important.
Les observations effectuées à la 24ème heure montrent une aggravation du chémosis avec fermeture totale de l'oeil ; la rougeur conjonctivale perdure, un important larmoiement est encore visible. Ces lésions s'aggravent les jours suivants (présence de pus, lecture difficile).
Une atteinte importante de l'iris est observée 48 heures après l'instillation du produit. Une opacification importante intéressant toute la surface cornéenne est notée 24 heures après le traitement, elle tend à s'aggraver par la suite (les détails de l'iris ne sont plus visibles).

Pour des raisons d'éthique et compte-tenu de l'absence de réversibilité des lésions observées, l'animal a été sacrifié 8 jours après le traitement. Le produit n' a pas été testé sur les deux autres lapins.

L'interprétation des résultats faite selon la Directive Européenne 67/548/CEE permet de classer le produit **Alkacide - lot 0597** parmi les produits **irritants** pour l'oeil avec risques de lésions oculaires graves.

OCDE 405

EVALUATION DE L'EFFET IRRITANT et/ou CORROSIF AIGU SUR LES YEUX DU LAPIN

ALKACIDE DESINFECTANT – lot 0597

N° étude : T 304 / 5089

Mode d'application : 0.1 ml de produit pur dans l'oeil droit
Début d'essai : 06.06.94

N° ax	J1 (1h)	24 heures	48 heures	72 heures	Moyenne	J5	J6	J7	J8
CONJONCTIVE									
Chemosis (A)									
3317	2	4	4	4	**4,0**	4	4	4	4
Larmoiements (B)									
3317	2	3	3	3	**3,0**	3	3	3	3
Rougeurs (C)									
3317	3	3	3	3	**3,0**	3	3	3	3
IRIS (D)									
3317	1	1	2	2	**1,7**	2	2	2	2
CORNEE									
Opacité (E)									
3317	1	3	4	4	**3,7**	4	4	4	4
Surface d'opacité (F)									
3317	1	4	3	4	**3,7**	4	4	4	4

EVIC-CEBA
LABORATOIRE DE RECHERCHE ET D'EXPERIMENTATION

RAPPORT D'ETUDE : T 308/5089 du 2 Août 1994

ALKAPHARM

Evaluation de l'effet irritant/corrosif aigu sur les yeux de la préparation

Alkacide désinfectant – lot 0597 à 5 % dans l'eau distillée

BG/CP

Ce rapport contient 9 pages

Z.I. - 33295 BLANQUEFORT - FRANCE
TÉLEX 550 717 - FAX 56 95 05 22
TÉL. 56 35 02 25

1, rue Massue - 94300 VINCENNES - FRANCE
FAX (1) 48 08 62 31
TÉL. (1) 43 65 03 03

S.A. AU CAPITAL DE 2 400 000 FRS - RC 70B70 BORDEAUX - SIRET 470 200 700 00016 - FR 79470200700

Laboratoire accrédité par le
Réseau National d'Essais sous le
n° 29.85/01

Evaluation de l'effet irritant/corrosif aigu sur les yeux de la préparation

Alkacide désinfectant – lot 0597 à 5 % dans l'eau distillée

Référence de l'étude	: T 308/5089
Protocole utilisé	: ligne directrice 405 de l'OCDE
Produit étudié	: Alkacide désinfectant – lot 0597 dilué à 5 % dans l'eau distillée
Commanditaire	: ALKAPHARM
Moniteur de l'étude	: N. SALKIND
Lieu de réalisation de l'étude	: EVIC CEBA – 33295 BLANQUEFORT
Technicien responsable	: Florence PROD'HOMME
Directeur de l'étude	: Philippe DUFOUR
Assurance Qualité	: Patrick GOMOND
Directeur du Laboratoire d'Essai	: Philippe MASSON
Dates d'essai	
Début d'étude	: 13 Juin 1994
Fin d'étude	: 23 Juin 1994

RESULTATS ET CONCLUSION

L'instillation de la préparation **Alkacide désinfectant – lot 0597** à 5 % dans l'eau distillée à la dose de 0,1 ml dans l'oeil de 3 lapins provoque dans l'heure qui suit une importante irritation des conjonctives oculaires et palpébrales (rougeur diffuse, légère tuméfaction, larmoiement important). Ces réactions régressent totalement en moins de 8 jours. Des lésions discrètes de l'iris (congestion) et de la cornée sont notées dans les 24 heures suivant l'instillation du produit ; elles sont rapidement réversibles.

Selon la directive Européenne 67/548/CEE la préparation testée peut être considérée comme **non irritante** pour l'oeil.

Le rapport d'étude ne concerne que l'objet soumis à l'essai.

1. INTRODUCTION

. But de l'étude

Déterminer sur l'oeil du lapin l'effet irritant/corrosif d'une substance afin d'extrapoler ses propriétés irritantes à l'être humain.

. Protocole utilisé

L'essai est réalisé selon la ligne directrice 405 de l'OCDE.

2. PRODUIT ETUDIE

- Dénomination, référence : Alkacide désinfectant – lot 0597
- Aspect : liquide bleuté
- Quantité reçue, conditionnement : 250 ml, flacon en plastique
- Date de réception : 3 Juin 1994
- Numéro d'enregistrement au Laboratoire : 5089
- Fiche d'informations : non communiquée
- Contrôle de l'homogénéité : non exigé pour les études inférieures à 28 jours
- Stockage : à température ambiante, à l'abri de la lumière et de la chaleur
- Archivage : échantillon du produit conservé pendant 10 ans. Le rapport final et les données brutes de l'essai sont archivés dans la salle réservée à cet effet, dans le Laboratoire d'Essai.
- Valeur du pH = 6.7 (produit dilué à 5 %)

3. MODE OPERATOIRE

. Système réactif

- Espèce, souche, origine : lapin albinos, Néo-zélandais, élevage COB.LABO.LAP. (22120 – YFFINIAC, FRANCE).
- Raison du choix de l'espèce : le lapin albinos est l'espèce recommandée pour ce type d'étude, car dans la plupart des cas, il est plus sensible que l'Homme aux agents irritants ou corrosifs oculaires.

- Nombre, sexe : 3 mâles
  Si des effets prononcés sur l'oeil sont prévisibles, l'essai est réalisé sur un animal. En fonction des résultats, l'étude peut ne pas être continuée avec les 2 autres animaux.

- Poids moyen : 2,8 kg

- Identification : bague auriculaire

- Acclimatation : au moins 5 jours

- Stabulation, nourriture : conditions de stabulation conformes aux exigences de la directive 86/609/CEE (en cage individuelle sur grille). Aliment granulé Energie U326, COFNA (37000 - TOURS, FRANCE).

. Conditions d'utilisation du produit

Après avoir vérifié que les deux yeux de chaque animal d'expérience sont sains et sans défaut, la substance est instillée dans le cul-de-sac conjonctival de l'oeil droit à la dose de 0,1 ml ou 0,1 g si le produit est pateux ou solide.
Les paupières sont maintenues fermées pendant environ 1 seconde pour éviter la perte de substance et favoriser le contact.

L'oeil gauche, qui ne subit pas le traitement sert de témoin.

Après 1 heure de contention, les animaux sont remis dans leur cage.

Dans cet essai, le produit est utilisé en solution à 5 % dans l'eau distillée à la dose de 0,1 ml par oeil.

. Examens cliniques et notations

Pour procéder à l'évaluation de l'irritation oculaire, les animaux sont immobilisés sur une table et les yeux examinés comparativement 1 h, 24 h, 48 h et 72 h après l'instillation du produit.

L'essai est arrêté si aucune irritation ne se manifeste après 72 heures. Il peut être prolongé au maximum pendant 21 jours si l'irritation oculaire est persistante ou en cas d'atteinte cornéenne. Si les lésions sont trop graves, pour éviter toute douleur inutile, l'animal est sacrifié.

Les réactions sont examinées au moyen d'une lampe loupe à lumière blanche et de Wood intégrées.

Après enregistrement des observations effectuées à la 24ème heure, l'examen des yeux est poursuivi au moyen de fluoresceine.

La cotation des irritations oculaires aux différents intervalles d'observation pour chaque lapin est effectuée selon l'échelle numérique (critères de Draize) ci-après en suivant l'ordre décrit :

Conjonctive

Chémosis (A) : paupières et/ou membrane nictitante

- Pas de tuméfaction 0
- Toute tuméfaction supérieure à la normale (y compris de la membrane nictitante) 1
- Tuméfaction évidente avec éversion partielle des paupières 2
- Tuméfaction avec paupières à peu près à moitié fermées 3
- Tuméfaction avec paupières plus qu'à moitié fermées 4

Larmoiement (B) :

- Absence de larmoiement 0
- Larmoiement léger (ne pas tenir compte des légères sécrétions existant normalement dans l'angle interne) 1
- Larmoiement avec humidification des paupières et des poils avoisinant les paupières 2
- Larmoiement avec humidification des paupières et des poils sur de larges surfaces autour de l'oeil 3

Rougeur (C) : s'applique aux conjonctives palpébrale et bulbaire, à la cornée et à l'iris

- Vaisseaux sanguins normaux 0
- Nette hyperhémie de certains vaisseaux sanguins (yeux injectés) 1
- Coloration pourpre diffuse, vaisseaux sanguins individuels difficilement discernables 2
- Coloration rouge soutenu diffuse 3

Iris (D)

- Normal 0

- Plis nettement plus profonds, congestion, tuméfaction, hyperhémie péricornéenne modérée ou conjonctives injectées, n'importe lequel de ces symptômes ou toute combinaison de plusieurs d'entre eux, l'iris continuant à réagir à la lumière (une réaction lente est positive) 1

- Absence de réaction à la lumière, hémorragie, destruction marquée (chacun de ces symptômes ou l'ensemble) 2

Cornée

Opacité (E) : degré de densité (les observations portent sur les zones les plus denses)

- Pas d'ulcération ni d'opacité 0

- Zones d'opacité (autre qu'un léger ternissement de l'éclat normal) dispersées ou diffuses, détails de l'iris nettement visibles 1

- Zone translucide aisément discernable, détails de l'iris légèrement masqués 2

- Zones nacrées, détails de l'iris complètement invisibles, dimension de la pupille à peine discernable 3

- Cornée opaque, iris non discernable à travers l'opacité 4

Surface d'opacité (F) :

- Un quart (ou moins mais non nulle) 1

- Entre le quart et la moitié 2

- Entre la moitié et les trois quarts 3

- Des trois quarts à toute la surface 4

. Interprétation des résultats

Selon la directive 67/548/CEE, la substance ou préparation testée est considérée comme **irritante pour les yeux** si elle provoque des lésions oculaires importantes qui surviennent au cours des 72 heures suivant l'instillation et persistent 24 heures au moins.

Une lésion oculaire est considérée comme importante si les valeurs moyennes des mesures pour chaque type de lésion calculées pour chaque animal d'après les observations effectuées aux lectures 24, 48 et 72 heures sont équivalentes, chez deux animaux au moins aux valeurs suivantes :

. 2 ≤ opacité cornéenne	< 3
. 1 ≤ lésion de l'iris	< 2
. rougeur de la conjonctive	≥ 2,5
. oedème de la conjonctive (chémosis)	≥ 2

Il y a risque de lésions oculaires graves lorsque ces lésions (chez 2 animaux au moins) sont équivalentes à :

. opacité cornéenne	≥ 3
. lésion de l'iris	= 2

Les lésions oculaires sont également graves lorsqu'elles persistent à la fin de la période d'observation (directive 93/21/CEE).

4. RESULTATS ET CONCLUSION

Les lésions oculaires constatées chez chaque animal au moment de chaque observation sont rapportées dans le tableau ci-après.

Une heure après l'instillation du produit testé, des réactions importantes sont notées au niveau des conjonctives : coloration rouge diffuse, légère tuméfaction. Elles sont accompagnées d'un larmoiement important.
72 heures plus tard, ces lésions tendent à régresser pour disparaître totalement en moins de 8 jours.
Une congestion de l'iris est notée chez tous les animaux 1 heure à 24 heures après le traitement. Cette réaction est rapidement réversible. Un lapin a présenté pendant 48 heures une opacification diffuse de la cornée.

L'interprétation des résultats faite selon la Directive Européenne 67/548/CEE permet de classer la préparation **Alkacide désinfectant – lot 0597** à 5 % dans l'eau distillée parmi les préparations **non irritantes** pour l'oeil.

OCDE 405

EVALUATION DE L'EFFET IRRITANT / CORROSIF AIGU SUR LES YEUX DU LAPIN

Produit : ALKACIDE DESINFECTANT – lot 0597

N° étude : T 308 / 5089

Mode d'application : 0.1 ml de produit dilué à 5% dans l'oeil droit
Début d'essai : 13.06.94

N° ax	J1 (1h)	24 heures	48 heures	72 heures	Moyenne	J5	J6	J7	J8
CONJONCTIVE									
Chemosis (A)									
3330	1	1	0	0	**0,3**	0			
3372	1	1	1	1	**1,0**	1	0	0	
3378	1	2	2	1	**1,7**	1	1	1	0
Larmoiements (B)									
3330	2	1	0	0	**0,3**	0			
3372	2	2	2	1	**1,7**	0	0	0	
3378	1	2	2	1	**1,7**	0	0	0	0
Rougeurs (C)									
3330	2	2	2	1	**1,7**	0			
3372	2	2	2	2	**2,0**	1	1	0	
3378	2	2	2	2	**2,0**	1	1	1	0
IRIS (D)									
3330	1	0	0	0	**0,0**	0			
3372	1	0	0	0	**0,0**	0	0	0	
3378	0	1	1	1	**1,0**	0	0	0	0
CORNEE									
Opacité (E)									
3330	0	1	1	0	**0,7**	0			
3372	0	0	0	0	**0,0**	0	0	0	
3378	0	0	0	0	**0,0**	0	0	0	0
Surface d'opacité (F)									
3330	0	1	1	0	**0,7**	0			
3372	0	0	0	0	**0,0**	0	0	0	
3378	0	0	0	0	**0,0**	0	0	0	0

EVIC-CEBA
LABORATOIRE DE RECHERCHE ET D'EXPERIMENTATION

ETUDE : Te 772b / 98-4557

ALKAPHARM

EVALUATION DU POTENTIEL DE SENSIBILISATION CUTANEE CHEZ LE COBAYE

- Essai par maximisation - EMC -

NF.EN.ISO 10993-10- Mars 1996

ALKACIDE

- RAPPORT D'ETUDE -

Ce rapport comporte 14 pages dont 4 en Annexes

Blanquefort, le 10 février 1999

Z.I. 48, rue Jean Duvert - 33295 BLANQUEFORT - FRANCE
TÉL. (33) 05 56 95 59 95
FAX (33) 05 56 95 05 22
E mail : evic ceba@aol.com
S.A. au capital de 2 400 000 Frs - RC 70B70 Bordeaux - SIRET 470 200 700 00016 - FR 79470200700

1, rue Massue - 94300 VINCENNES - FRANCE
TÉL. (33) 01 41 74 40 00
FAX (33) 01 41 74 40 19

SOMMAIRE

RESUME 2

1. OBJECTIF ET PRINCIPE DE L'ESSAI 3

2. AUTORISATIONS ET RESPONSABILITES 3

3. ASSURANCE QUALITE 3

4. DEFINITION DE LA PREPARATION ETUDIEE 4

4.1. Référence de la préparation 4

4.2. Stockage 4

5. SYSTEME REACTIF 4

6. MODE OPERATOIRE 5

6.1. Préparation à tester 5

6.2. Niveaux de dose - essais préliminaires 5

6.3. Essai proprement dit : détermination du potentiel de sensibilisation cutanée 6

6.4. Interprétation des résultats 9

6.5. Vérification de la sensibilité et de la fiabilité de la méthode 9

7. RESULTATS 10

7.1. Essais préliminaires 10

7.2. Essai proprement dit 10

8. CONCLUSION 10

ANNEXES 11-14

EVALUATION DU POTENTIEL DE SENSIBILISATION CUTANEE CHEZ LE COBAYE - ESSAI PAR MAXIMISATION - EMC - LIGNES DIRECTRICES 406 DE L'OCDE (17/7/1992)

SKIN SENSITISATION BY THE GUINEA PIG MAXIMISATION TEST METHOD - GPMT - OECD GUIDELINE 406 (17/7/1992)

RESUME/*SUMMARY*

- **Préparation étudiée/*Test preparation* : ALKACIDE**

- **Principe de l'essai/*Principle of the study* :**

L'objectif de l'essai a été d'évaluer, chez 30 cobayes, le potentiel sensibilisant de la préparation à l'essai appliquée par voie cutanée. L'effet recherché a été maximisé par injection d'Adjuvant Complet de Freund. Les animaux ont été exposés à la préparation à l'essai par injection intradermique et application topique dans des conditions irritantes (exposition d'induction). Après une période de repos de 10 à 14 jours (période d'induction), les animaux ont été exposés à une dose de déclenchement.

L'étendue et le degré de la réaction cutanée des animaux ont été comparés à ceux de la réaction observée chez les animaux témoins ne recevant que le véhicule lors de l'induction et soumis à l'exposition de déclenchement.

La préparation à tester a été classée en fonction du pourcentage d'animaux réactifs.

The aim of the study was to assess, in 30 guinea-pigs, the skin sensitisation potential of the test preparation. The effect was potentiated by the injection of Freund's Complete Adjuvant. The animals were initially exposed to the test preparation by intradermal injection and epidermal application (induction exposure). Following a rest period of 10 to 14 days (induction period), the animals were exposed to a challenge dose.

The extent and degree of skin reaction to the challenge exposure in the test animals were compared with those demonstrated by control animals which underwent sham treatment during induction and received the challenge exposure.

The test preparation was classified in accordance with the percentage of reactive animals.

- **Dates de l'essai/*Dates of the study* :** du/*from* 21/12/98 au/*to* 05/02/99

- **Résultats/*Results* :**

Pourcentage d'animaux réactifs/percentage of reactive animals : 0%

- **Conclusion/*Conclusion* :**

La préparation testée est classée parmi les préparations **non sensibilisantes** par contact avec la peau (classe 1).
***The test preparation** is classified among the products **non sensitizing** by contact with the skin (class 1).*

1. OBJECTIF ET PRINCIPE DE L'ESSAI

L'objectif de l'essai a été d'évaluer, chez le Cobaye, le potentiel sensibilisant de la préparation **ALKACIDE** par voie cutanée. L'effet recherché a été maximisé par injection d'Adjuvant Complet de Freund (ACF).

Le cobaye a été choisi, parce que représentant historiquement l'animal qui convient le mieux pour ce type d'essai.

Les animaux ont été dans un premier temps exposés au préparation à l'essai par injection intradermique et application topique dans des conditions irritantes (exposition d'induction). Après une période de repos de 10 à 14 jours (période d'induction) au cours de laquelle une réaction immunitaire a pu se produire, les animaux ont été exposés à une dose de déclenchement.

L'étendue et le degré de la réaction cutanée des animaux ont été alors comparés à ceux de la réaction observée chez les animaux témoins qui ont reçu le véhicule lors de l'induction et qui ont été soumis à l'exposition de déclenchement.

La méthodologie utilisée a suivi la ligne directrice n° 406 de l'OCDE du 17 juillet 1992 concernant les essais de substances chimiques et la section B6 de l'annexe IV.C de la Directive Européenne 96/54/CEE du 30 juillet 1996, parue au Journal Officiel des Communautés Européennes du 30 septembre 1996 (L248) et la partie 10 « Essais d'irritation » de la norme ISO NF.EN.ISO 10993 (mars 1996) qui reproduit intégralement la norme internationale ISO 10993-10-1995.

Elle s'est inspirée de la technique décrite par B. Magnusson et A. Kligman dans J. Invest. Dermatol, 1969, 52, 3, 268-276.

2. AUTORISATIONS ET RESPONSABILITES

Cette étude a été couverte par l'accréditation de la **section Essais du COFRAC** qui a attesté de la compétence technique du Laboratoire.

L'étude a été intégralement réalisée dans les locaux des Laboratoires Evic-Ceba à Blanquefort, selon les règles d'éthique animale indiquées dans la **Directive Européenne 86/609/CEE du 24 novembre 1986** et a été soumise à l'avis préalable du Comité d'Ethique animale interne au Laboratoire d'Essais.

L'étude a été effectuée sous l'autorité du Directeur d'Etudes, conformément aux principes des **Bonnes Pratiques de Laboratoire** dans le cadre de la toxicologie expérimentale (Instruction du 31 mai 1983, texte officiel n° 1065 référencé SN - S/83/25, publié par le Ministère français des Affaires Sociales et de la Solidarité Nationale et Directive 87/18/CEE du 18 décembre 1986 et son décret d'application N° 90-206 du 07 mars 1990 paru au J.O.R.F. du 09 mars 1990), le laboratoire disposant par ailleurs, de la reconnaissance de conformité aux principes des Bonnes Pratiques de Laboratoire par le **GIPC** et **l'Agence du médicament**.

3. ASSURANCE QUALITE

Toutes les données recueillies au cours de l'essai ont été consignées par le technicien en charge de l'étude, sur les documents réservés à cet effet.

Chaque page de ces documents a été paraphée et datée par le technicien responsable de l'étude.
Toute donnée manquante a été justifiée et toute correction a été paraphée et datée.

Le Service Assurance Qualité a vérifié par des inspections régulières, le respect du protocole et des procédures de travail relatives à ce type d'essai.

Les données expérimentales et le rapport d'étude ont été audités conformément à la procédure mise en place au Laboratoire d'Essais.

La dernière inspection a eu lieu le 4 février 1999.

En fin d'étude, les documents de travail ont été archivés avec le rapport d'étude et seront conservés pendant 10 ans.

4. DEFINITION DE LA PREPARATION ETUDIEE

4.1. Référence de la préparation

Le Commanditaire a fait parvenir au Laboratoire 1 flacon en plastique contenant 250 ml de la préparation **ALKACIDE.**

Il s'agissait d'un liquide bleu.

Cette préparation a été enregistrée au Laboratoire sous la référence 98-4557.

4.2. Stockage

La préparation a été stockée à température ambiante et à l'abri de la lumière dans un local spécialement aménagé à cet effet.

Un échantillon de préparation a été classé dans l'échantillothèque du Laboratoire à titre de référence ; il y sera conservé jusqu'à la date de péremption ou, au plus, pendant 10 ans.

5. SYSTEME REACTIF

Espèce : Cobayes albinos Hartley

Origine : Elevage Charles River (76410 Saint Aubin les Elbeuf, France)

Poids à la mise en période d'acclimatation : inférieur ou égal à 500 g (essai proprement dit)

Sexe : femelles nullipares et non gravides

Nombre : 35

- pour les essais préliminaires : 5

- 2 pour la confirmation de la concentration maximale irritante (irritation de niveau érythèmal 2) après injection intradermique,
- 3 pour la confirmation de la concentration maximale irritante (irritation de niveau érythèmal 1) par application topique et pour la détermination de la concentration maximale non irritante par application topique.

- pour l'essai proprement dit : 30

- 20 pour le groupe traité
- 10 pour le groupe témoin

Acclimatation : pendant 5 jours au moins avant le début de l'essai

Identification : chaque animal a été identifié par un marquage auriculaire et le numéro correspondant a été reporté sur une étiquette apposée sur sa cage

Hébergement : les animaux ont été hébergés à raison de 1 par cage, dans des cages en polypropylène de 31 cm x 46 cm x 19 cm munies d'un couvercle en inox.
La litière renouvelée régulièrement a été constituée de sciure dépoussiérée. Elle a été livrée par SICSA (94142 ALFORTVILLE, France).

Les cages ont été placées dans un local d'accès limité, de 7 m x 4 m x 3 m maintenu en légère surpression (10 mm d'eau minimum), sous air régulé en température (t = 21 ± 3°C) et humidité relative contrôlée (HR = 50 ± 20 %) excepté pendant les cycles de lavage et dont le renouvellement en air non recyclé filtré (sur filtre 99 %) s'est fait à raison de 10 cycles par heure environ.
L'éclairage artificiel a assuré 12 heures de lumière par jour et 12 heures d'obscurité.
Tout le personnel qui est entré dans l'animalerie a revêtu des vêtements spécifiques.

Nourriture : l'aliment complet a été fourni sous forme de granulé 106, garantissant une teneur appropriée en acide ascorbique, livré par UAR (91360 Epinay sur orge, France).

Boisson : eau d'adduction distribuée en biberons en polypropylène munis d'une tétine en inox.
Un échantillon d'eau est prélevé après toute intervention technique sur la canalisation et au minimum tous les 6 mois et envoyé pour analyse physico-chimique et bactériologique à un organisme de contrôle spécialisé.

6. MODE OPERATOIRE

6.1. Préparation à tester

La préparation a été utilisée, dans les essais préliminaires et l'essai proprement dit, en application topique, diluée dans l'eau pour préparation injectable (eau PPI), véhicule choisi après réalisation d'essais préalables de solubilité.

En injection intradermique, pour les essais préliminaires et l'essai proprement dit, la préparation a été utilisée diluée dans l'eau PPI.

La préparation du produit s'est faite extemporanément chaque jour de traitement en quantité suffisante pour les besoins de l'essai. Le mode de préparation a été reporté dans le document de travail réservé à cet effet.

La préparation a été réalisée en salle d'étude selon les modalités définies dans la procédure du Laboratoire.

6.2. Niveaux de dose - essais préliminaires

La concentration de préparation à tester utilisée pour chaque exposition inductrice était bien tolérée par l'organisme et a correspondu à la concentration maximale entraînant une irritation cutanée légère à modérée (CMI), lue 24 heures après injection intradermique et 48 heures après application topique.

La concentration utilisée pour l'exposition déclenchante a été la concentration maximale non irritante pour la peau (CMNI).

6.2.1. Confirmation de la CMI par injection intradermique - (CMI_{ID})

Avant l'essai proprement dit, 2 cobayes préalablement traités à l'Adjuvant Complet de Freund ont été tondus au niveau dorso-lombaire sur une surface d'environ 30 cm^2. Ils ont reçu, de part et d'autre de la colonne vertébrale, la préparation à l'essai sous forme d'extrait à 4 concentrations différentes en injection intradermique, sous un volume de 0,1 ml.

La concentration la plus forte a été fixée à **5 %** dans l'eau PPI par le Commanditaire.
Les trois autres concentrations choisies ont été : 2,5 % - 1,25 % - 0,625 % dans l'eau PPI

24 heures ± 1 heure après l'injection, les réactions d'irritation cutanée ont été appréciées selon l'échelle de cotation utilisée dans l'essai proprement dit (paragraphe 6.3.4).

La CMI_{ID} ou concentration maximale entraînant une irritation de type érythémal chez les animaux (d'intensité 2 selon Magnusson et Kligman pour au moins l'un d'entre-eux) après injection intradermique a été déterminée et retenue pour l'exposition inductrice par voie intradermique lors de l'essai proprement dit.

Toutes les données ont été consignées dans le document de travail réservé à cet effet.

6.2.2. Confirmation de la CMI par application topique (CMI_T) et de l'effet non irritant par application topique (CMNI)

Plusieurs jours avant l'essai proprement dit, 3 cobayes ont été tondus au niveau scapulaire sur une surface d'environ 60 cm². Ils ont reçu, de part et d'autre de la colonne vertébrale, sur la région débarrassée de ses poils, 3 paires d'injections intradermiques, sous un volume de 0,1 ml, des 3 préparations suivants :

① Adjuvant Complet de Freund (ACF) dilué à 50 % dans l'eau PPI (v/v)
② Eau PPI (véhicule)
③ mélange 50/50 des solutions ② et ① (v/v).

Après une période de repos de 7 jours, les animaux ont été à nouveau tondus au niveau dorso-lombaire.
Les sites de peau ont été repérés. Conformément aux exigences du Commanditaire, 4 concentrations différentes (5% - 2,5 % - 1,25 % - 0,625 %) de la préparation dans le véhicule choisi (Eau PPI) ont été déposés sur des pansements composés d'un carré de papier filtre de 2 x 2 cm (soit 4 cm²), posé sur un carré de gaze hydrophile de 4 cm², lui-même posé sur un morceau de film occlusif Blenderm® de 45 cm². Les pansements occlusifs ont été maintenus en place au moyen d'un film adhésif Micropore® qui a entouré le tronc de l'animal sans provoquer de gêne respiratoire.

La quantité de la préparation à l'essai (ou de ses dilutions) déposée sur le pansement a été de : 0,20 ml.

Les pansements ont été maintenus 24 heures ± 1 heure au contact avec la peau. Après ce temps de contact, ils ont été enlevés.
Les réactions d'irritation cutanée ont été appréciées, selon l'échelle de cotation utilisée dans l'essai proprement dit (paragraphe 6.3.4) après l'enlèvement des pansements.

La préparation a été retenue comme CMI_T (ou concentration maximale irritante topique) si elle a entraîné au maximum une irritation de type érythémal d'intensité 1 chez au moins 1 des 3 animaux

Le Directeur d'Etudes a éventuellement retenu, si aucun érythème n'a été observé, la nécessité d'induire une irritation préalable avec du lauryl sulfate de sodium pour l'exposition inductrice par voie topique lors de l'essai proprement dit.

La CMNI ou concentration maximale n'induisant aucune réaction cutanée chez les 3 animaux a été déterminée et retenue pour l'exposition déclenchante de l'essai proprement dit ainsi que la CMNI/2 ou une concentration inférieure à la CMNI/2 (concentration de « sécurité » compte tenu du faible effectif d'animaux dans les essais préliminaires).

Toutes les données ont été consignées dans le document de travail réservé à cet effet.

6.3. Essai proprement dit : détermination du potentiel de sensibilisation cutanée

6.3.1. Répartition des animaux par lot

Les animaux ont été tondus, au niveau scapulaire, à **J-1** (en période d'acclimatation) en évitant toute abrasion de la peau.

A **J1,** les 30 animaux ont été répartis entre le lot traité et le lot témoin par tirage au hasard, selon la table de randomisation de Moses et Oakford.

Le groupe traité a été soumis à toutes les phases de l'expérimentation : induction et déclenchante avec la préparation à tester.
Le groupe témoin n'a reçu la préparation à tester qu'en fin d'essai en application primaire.

Les animaux ont été pesés et mis en cage individuelle.

6.3.2. Expositions inductrices

A J1 : injections intradermiques

- Groupe témoin = lot 1

Trois paires d'injections intradermiques, sous un volume de 0,1 ml, ont été effectuées dans la région scapulaire de part et d'autre de la ligne médiane.

① ACF dilué à 50 % dans l'eau PPI (v/v)
② Eau PPI (véhicule)
③ mélange 50/50 des solutions ② et ① (v/v).

- Groupe traité = lot 2

Trois paires d'injections intradermiques, sous un volume de 0,1 ml, ont été parallèlement effectuées aux mêmes sites et dans le même ordre que pour les animaux témoins.

① ACF dilué à 50 % dans l'eau PPI (v/v)

② la préparation à l'essai à la concentration définie précédemment (CMI_{ID}) (la solution a été homogénéisée par aspirations et refoulements successifs avec une seringue sans aiguille).

③ la préparation à l'essai à la même concentration qu'en ② dans un mélange 50/50 (v/v) d'ACF et d'eau PPI (v/v) (le mélange a été homogénéisé par aspirations et refoulements successifs avec une seringue sans aiguille)

Pour l'injection 3, la préparation hydrosoluble a été dissoute dans la phase aqueuse avant d'être mélangée à l'ACF.

Les injections 1 et 2 ont été situées à proximité l'une de l'autre le plus près possible de la tête, tandis que l'injection 3 a été effectuée vers la partie caudale de la surface d'essai.

A J7 : après 6 jours de repos, les animaux ont été à nouveau tondus.

La préparation n'ayant pas provoqué d'irritation cutanée, la zone d'essai tondue a été badigeonnée avec 0,50 ml de lauryl sulfate de sodium à 10 % dans la vaseline, afin de créer une irritation locale. Ce traitement a été réalisé chez les 2 groupes d'animaux (traité et témoin).

A J8 : application topique

- Groupe témoin = lot 1

0,50 ml de véhicule (Eau PPI) a été déposé sur le pansement constitué d'un rectangle de papier filtre de 8 cm^2 (2 cm x 4 cm), posé sur un rectangle de gaze hydrophile de 8 cm^2, lui même posé sur un carré de film occlusif Blenderm® de 25 cm^2. Le pansement occlusif a été appliqué sur la peau et maintenu en place au moyen d'un film adhésif Micropore® qui a entouré le tronc de l'animal, pendant 48 heures ± 1 heure.

- Groupe traité = lot 2

0,50 ml de la préparation à l'essai à la CMI_T a été appliqué selon la méthode définie précédemment et laissé en contact avec la peau pendant 48 heures ± 1 heure.

A J10 : les pansements ont été enlevés et les réactions cutanées ont été observées et consignées dans le document de travail réservé à cet effet.

6.3.3. Exposition déclenchante

A J28 : application topique

Après une période de repos de 11 jours, les cobayes des 2 lots ont été tondus de part et d'autre de la colonne vertébrale au niveau dorso-lombaire, sur une zone qui n'a jamais été au contact de la préparation.

0,20 ml de préparation à sa CMNI et 0,20 ml de préparation à sa CMNI/2 ont été appliqués respectivement sur 2 pansements constitués chacun d'un carré de papier filtre de 2 cm² qui a reçu la préparation, posé sur un carré de gaze hydrophile de 4 cm², posé lui même sur un film occlusif Blenderm® de 25 cm².

Les pansements ont été maintenus sur l'un des flancs de l'animal par un film Micropore®.

Les pansements occlusifs ont été laissés en contact 24 heures ± 1 heure.

6.3.4. Observations et cotation

A J29 : les pansements ont été enlevés chez les animaux des 2 lots.

A J30 : 24 heures après l'enlèvement des pansements et donc 48 heures après le début de l'application, les réactions cutanées ont été observées et cotées, pour chaque animal, selon l'échelle de cotation de Magnusson et Kligman indiquée ci-dessous :

Erythème et formation d'escarre (E) :

- pas d'érythème 0
- léger érythème 1
- érythème bien défini 2
- érythème modéré 3
- érythème grave à formation de légère escarre 4

Formation d'oedème (O) :

- pas d'oedème 0
- oedème léger 1
- oedème bien défini 2
- oedème modéré 3
- oedème grave 4

Les animaux ont été tondus après les lectures.

A J31 et J32 : 24 et 48 heures plus tard, une seconde et une troisième observations (soit 48 et 72 heures après l'enlèvement des pansements et donc 72 et 96 heures après l'application) ont été réalisées.

Tous les animaux ont été pesés après la troisième lecture.

Toutes les réactions cutanées et toutes les constatations inhabituelles (oedèmes ...), y compris les réactions de l'organisme, liées aux opérations d'induction et de déclenchement ont été observées et enregistrées dans le document de travail réservé à cet effet.

6.4. Interprétation des résultats

Le potentiel sensibilisant de la préparation testé a été fonction du pourcentage d'animaux réactifs lors de l'exposition déclenchante. L'étendue et le degré de la réaction cutanée chez les animaux traités ont été comparés à ceux obtenus chez les animaux témoins qui ont subi un traitement identique, exception faite de la préparation pendant l'induction.

Une réaction d'indice ≥ 1 chez les animaux du groupe traité a indiqué généralement une sensibilisation si les animaux du groupe témoin ont montré des réactions < 1.

Si les animaux témoins ont présenté des réactions d'indice ≥ 1, les réactions des animaux traités supérieures à la réaction la plus grave chez les témoins ont été considérées comme des réactions de sensibilisation.

La préparation testé a été classe dans l'une des catégories suivantes en fonction du pourcentage d'animaux réactifs.

Pourcentage d'animaux réactifs*	Degré d'allergénicité	
0 - 10	I	non sensibilisant
11 - 30	II	faiblement sensibilisant
31 - 60	III	moyennement sensibilisant
61 - 80	IV	fortement sensibilisant
81 - 100	V	très fortement sensibilisant

* Le classement de la préparation a été basé sur la valeur la plus élevée des 3 pourcentages d'animaux réactifs définis 48, 72 et 96 heures après application.

6.5. Vérification de la sensibilité et de la fiabilité de la méthode

La sensibilité et la fiabilité de la technique expérimentale ont été vérifiées au cours le l'étude Te 670 du 10 novembre au 4 décembre 1998 à l'aide d'une préparation de référence connue pour avoir un potentiel sensibilisant cutané = le 2-mercapto- benzothiazole (N° CAS 149-30-4 / N° EINECS 205-736-8 - dénomination usuelle : Kaptax) utilisé dans les conditions suivantes :

CMI_{ID} = 1 % dans l'huile d'olive,
CMI_T = 25 % dans la vaseline + irritation cutanée au lauryl sulfate de sodium,
CMNI = 2 et 5 % dans la vaseline.
Le pourcentage d'animaux réactifs lors de l'épreuve déclenchante a été égal à 100 %.

7. RESULTATS

7.1. Essais préliminaires

Les réactions cutanées observées lors de la détermination de la CMI_{ID} sont regroupées en Annexe I.

La CMI_{ID} retenue a été égale 0,7 % dans l'eau PPI.

Les réactions cutanées observées lors de la détermination des CMI_T et CMNI sont regroupées en Annexe II.

La CMI_T retenue a été égale à 5 % dans l'eau PPI.

Par ailleurs le Directeur d'études a retenu la nécessité d'induire une irritation préalable avec du lauryl sulfate de sodium pour l'exposition inductrice par voie topique lors de l'essai proprement dit.

La CMNI retenue a été égale à 2,5 % dans l'eau PPI.

La CMNI/2 retenue a été égale à 1,25 % dans l'eau PPI.

7.2. Essai proprement dit

Les poids individuels des animaux à J1 et à J25 sont fournis en Annexe III.

Les réactions cutanées observées lors de l'exposition déclenchante sont regroupées en Annexe IV.

8. CONCLUSION

Compte tenu des critères de jugement adoptés, la préparation **ALKACIDE** a été classée **non sensibilisante** par contact avec la peau (classe 1).

17.02.99

Patrick GOMOND
Directeur d'Etudes

18.02.99

p.o. **Philippe MASSON**
Biologiste
Directeur du Laboratoire d'Essais

18.02.99

Nathalie DROSS
Responsable Assurance Qualité

Annexe I

Confirmation de la CMI_{ID}

Véhicule = Eau PPI (Méram lot 88558)

N° des animaux	Réactions cutanées* en fonction de la concentration							
	5 %		2,5 %		1,25 %		0,625 %	
	E	0	E	0	E	0	E	0
2077	*	1	*	1	2a	1	2	0
2078	*	1	*	1	2a	1	2	0

*Légende : échelle de cotation**

0 : pas de modification visible

1 : érythème discret ou en taches

2 : érythème modéré et confluent

3 : érythème intense et tuméfaction

** : brûlure verte sur toute la surface de l'injection intradermique*

a : brûlure verte au site d'injection de l'injection intradermique

Annexe II

Confirmation des CMI_T et CMNI

Véhicule = Eau PPI (Méram lot 88558)

N° des animaux	Réactions cutanées* en fonction de la concentration							
	5 %		2,5 %		1,25 %		0,625 %	
	E	O	E	O	E	O	E	O
2398	0	0	0	0	0	0	0	0
2399	0	0	0	0	0	0	0	0
2400	1	0	0	0	0	0	0	0

*Légende : échelle de cotation**

0 : pas de modification visible

1 : érythème discret ou en taches

2 : érythème modéré et confluent

3 : érythème intense et tuméfaction

Annexe III

Poids Corporel

Lot 1 : groupe témoin

N° des animaux	Poids (en g)		
	J1	J32	J32-J1
2409	366.1	543.4	177.3
2410	314.7	495.4	180.7
2411	377.3	527.7	150.4
2412	354.2	563.1	208.9
2413	348.6	520.2	171.6
2414	369.9	552.6	182.7
2415	326.8	483.1	156.3
2416	343.6	520.3	176.7
2417	361.8	518.3	156.5
2418	351.4	482.7	131.3
Moyenne	351.44	520.68	169.24
Ecart-type	19.34	27.66	21.44

Lot 2 : groupe traité

N° des animaux	Poids (en g)		
	J1	J32	J32-J1
2439	360.7	551.6	190.9
2440	343.4	528.7	185.3
2441	343.2	535.8	192.6
2442	356.4	487.5	131.1
2443	366.2	550.8	184.6
2444	395.6	573.3	177.7
2445	356.1	557.2	201.1
2446	372.9	539.2	166.3
2447	361.5	543.8	182.3
2448	338.6	502.3	163.7
2449	396.9	588.3	191.4
2450	338.5	504.4	165.9
2451	353.5	527.8	174.3
2452	346.5	502.2	155.7
2453	370.6	539.2	168.6
2454	369.8	524.2	154.4
2455	349.4	532.6	183.2
2456	379.2	587.7	208.5
2457	384.0	577.9	193.9
2458	344.8	489.8	145.0
Moyenne	361.39	537.22	175.83
Ecart-type	17.81	30.40	19.54

Annexe IV

Exposition déclenchante

Lot 1 : groupe témoin **Véhicule = eau PPI (Méram lot 88558)**

N° des animaux	Réactions cutanées* en fonction de la concentration et du temps de lecture					
	2,5 %			1,25 %		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
2409	0	0	0	0	0	0
2410	0	0	0	0	0	0
2411	0	0	0	0	0	0
2412	0	0	0	0	0	0
2413	0	0	0	0	0	0
2414	0	0	0	0	0	0
2415	0	0	0	0	0	0
2416	0	0	0	0	0	0
2417	0	0	0	0	0	0
2418	0	0	0	0	0	0
% anx réactifs	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Lot 2 : groupe traité **Véhicule = eau PPI (Méram lot 88558)**

N° des animaux	Réactions cutanées* en fonction de la concentration et du temps de lecture					
	2,5 %			1,25 %		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
2439	0	0	0	0	0	0
2440	0	0	0	0	0	0
2441	0	0	0	0	0	0
2442	0	0	0	0	0	0
2443	0	0	0	0	0	0
2444	0	0	0	0	0	0
2445	0	0	0	0	0	0
2446	0	0	0	0	0	0
2447	0	0	0	0	0	0
2448	0	0	0	0	0	0
2449	0	0	0	0	0	0
2450	0	0	0	0	0	0
2451	0	0	0	0	0	0
2452	0	0	0	0	0	0
2453	0	0	0	0	0	0
2454	0	0	0	0	0	0
2455	0	0	0	0	0	0
2456	0	0	0	0	0	0
2457	0	0	0	0	0	0
2458	0	0	0	0	0	0
% anx réactifs	0%	0%	0%	0%	0%	0%

*Légende : échelle de cotation**
0 : pas de modification visible
1 : érythème discret ou en taches
2 : érythème modéré et confluent
3 : érythème intense et tuméfaction

ACS EUROPE
ADVANCED CHEMICAL SENSORS CO

- Laboratoire n° 11873
- Accréditation AIHA/IHLAC
- Agrément NIOSH (PAT Program)
- Procédures OSHA

RAPPORT D'ANALYSE

N° 96141

A Centre Hospitalier de Montreuil-Sur-Mer
Mme LEBORGNE Hélène
Cadre Hygiéniste - B.P.9
62170 MONTREUIL SUR MER

Date 12/12/96

Gaz prélevé(s) Vapeurs de GLUTARALDEHYDE du produit Alkacid (ALKAPHA

Badge n°	Date	Nom	Temps d'exposition (h)	Concentration (ppm)*
GF5330	18/11/96	IDE, Endoscopie	10H00 - 10h15 15 min	0.06 ppm
GF5331	18/11/96	IDE, Endoscopie	14H30 - 14H45 15 min	0.04 ppm

Commentaires

RAPPEL VALEUR : VLE : 0.2 ppm sur 15 mn (Ministère du travail).

Les concentrations relevées sont largement en dessous des valeurs limites d'exposition (Ministèrre du Travail)
A titre d'information, le seuil d'odeur du glutaraldehyde se ressent à environ 0,04 ppm.

* Les valeurs mentionnées sont les concentrations moyennes sur les périodes de prélèvement indiquées.

NB : Ce rapport est **confidentiel** et ne pourra être divulgué à des tiers.

CIS

Directeur de Laboratoire : Laurence D. Locker, Ph. D. Coordinateur contrôle qualité : Hannah K. Johnson, M.S.

REFERENCIAS

Orden: Estimación 7-FLE-1-7-05-890
Oferta: 7-FLE-1-7-05-890
Recibido Rouen: 15/11/05
Solicitado por: Sr. SALKIND
Cliente ID: ALKACIDE Lote 2005.07.01.67
Descripción: DM limpiador de pre-desinfección
Naturaleza: ALKACIDE
Comentarios:
Determinación de la biodegradabilidad intrínseca aeróbica.
Lote n° 2005.07.01.67

ALKAPHARM
30 AVENUE Amiral Lemonnier
78160 MARLY LE ROI
FRANCIA

A la atención de Sr.SALKIND

Rouen, 3 de julio 2014

INFORME DE ENSAYO
RN05-10014.001 ES Página 1 / 3

Parámetro:

Biodegradabilidad intrínseca aeróbica: Ensayo de desaparición de COD (Zahn-Wellens) OCDE 302 B

Principio: Una mezcla que contiene la muestra de ensayo, los nutrientes minerales y una cantidad relativamente importante de lodo activado en medio acuoso se agita y se ventila a 20-25 ° C en la oscuridad o bajo luz difusa durante un máximo de 28 días. El proceso de biodegradación se controla mediante la determinación del carbono orgánico disuelto a lo largo del tiempo.

Inóculo bacteriano: lodos y efluentes de la planta de tratamiento de aguas residuales de Rouen. Obtención por centrifugación del material microbiano y resuspensión en el medio de ensayo. La relación entre el inóculo (materia en suspensión) y la muestra de ensayo (DOC) es de 2,5 / 1 y 4,0 / 1 en el recipiente de ensayo final.

"Este documento se emite por la Compañía bajo sus Condiciones Generales de Servicio, a las que se puede acceder en http://www.sgs.com/terms_and_conditions.htm. Los documentos en formato electrónico se regirán por las condiciones para documentos electrónicos a las que se puede acceder en http://www.sgs.com/en/Terms-and-Conditions/Terms-e-Document.aspx.
La responsabilidad de SGS queda limitada en los términos establecidos en las citadas condiciones Generales que resultan de aplicación a la prestación de sus servicios.
Se advierte al poseedor de este documento que la información en él recogida refleja los resultados obtenidos por la Compañía en el momento de su intervención, habiendo sido llevada a cabo exclusivamente dentro de los límites establecidos tanto en el contrato como en las Condiciones Generales de Servicio. La compañía responde únicamente frente a su cliente, sin que pueda derivarse responsabilidad de ningún tipo de SGS frente a terceros ante los que se presente el certificado o reporte derivado de su intervención. El presente documento no podrá ser alterado ni modificado, ni en su contenido ni en su apariencia. En caso de modificación del mismo, SGS se reserva las acciones legales que estime oportunas para la defensa de sus legítimos intereses."
Salvo que expresamente se indique lo contrario, los resultados se refieren única y exclusivamente a las muestras analizadas. Dichas muestras serán conservadas por un plazo que, dependiendo de sus características propias –carácter perecedero, alteración de sus propiedades por el transcurso del tiempo, etc- en ningún caso excederá de 60 días, a menos que se haya pactado expresamente con el cliente un plazo mayor.
ADVERTENCIA: Los reportes emitidos como consecuencia de inspecciones o ensayos con base en muestras, contendrán la opinión de la compañía, única y exclusivamente sobre las muestras que hayan sido objeto de inspección o ensayo, por lo que bajo ninguna circunstancia podrá interpretarse que contienen una opinión sobre la totalidad del lote del que haya sido obtenida la muestra objeto de la inspección o ensayo. La Compañía no es responsable del origen o la fuente de donde ha(n) sido extraída(s) la(s) muestra(s)."

Muestra:
- ALKACIDE Lote 2005.07.01.67
- Almacenamiento: temperatura ambiente

Fechas de análisis:

D=0: 2005/12/15
D=4: 2005/12/19
D=6: 2005/12/21
D=14: 2005/12/29
D=21: 2006/01/05
D=28: 2006/01/12

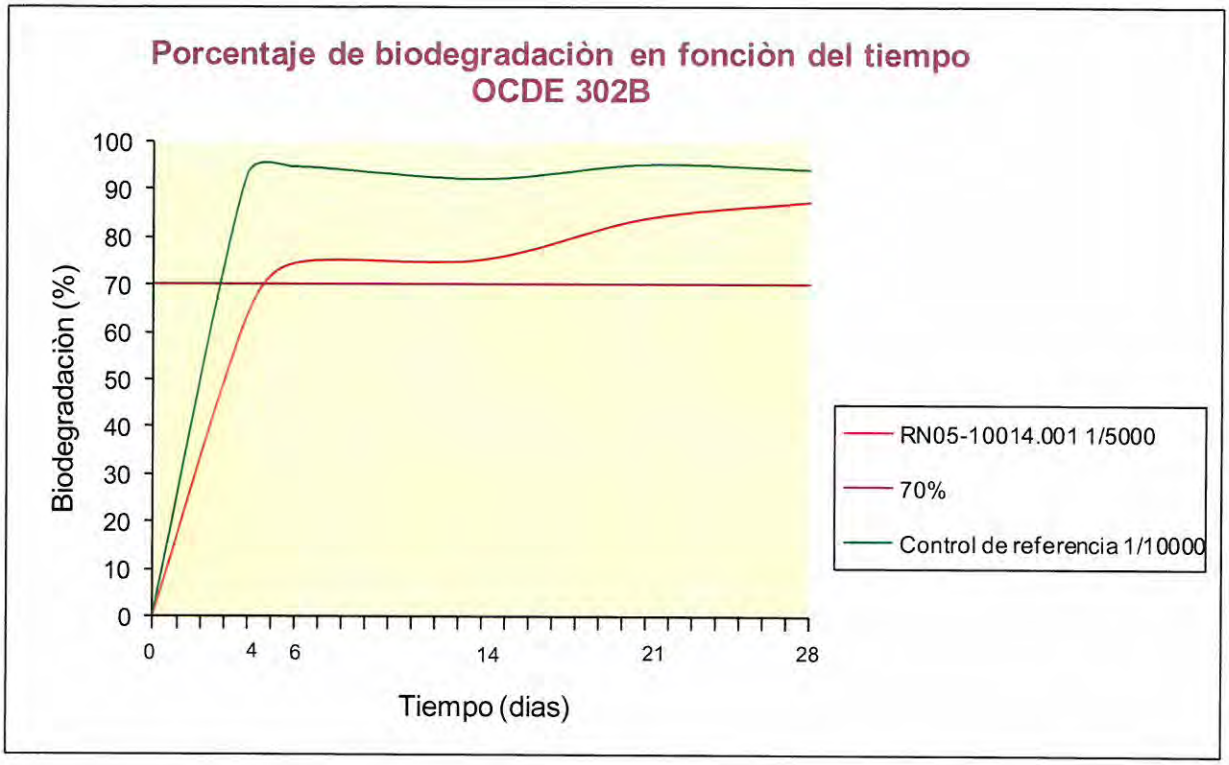
Resultados:

Porcentaje de biodegradación en función del tiempo:

Tiempo en días	**0**	**4**	**6**	**14**	**21**	**28**
Control de referencia	**0**	**92,6**	**94,5**	**92,0**	**95,0**	**93,9**
RN05-10014.001	**0**	**62,8**	**74,1**	**74,9**	**83,6**	**87,1**

"Este documento se emite por la Compañía bajo sus Condiciones Generales de Servicio, a las que se puede acceder en http://www.sgs.com/terms_and_conditions.htm. Los documentos en formato electrónico se regirán por las condiciones para documentos electrónicos a las que se puede acceder en http://www.sgs.com/en/Terms-and-Conditions/Terms-e-Document.aspx.
La responsabilidad de SGS queda limitada en los términos establecidos en las citadas condiciones Generales que resultan de aplicación a la prestación de sus servicios.
Se advierte al poseedor de este documento que la información en él recogida refleja los resultados obtenidos por la Compañía en el momento de su intervención, habiendo sido llevada a cabo exclusivamente dentro de los límites establecidos tanto en el contrato como en las Condiciones Generales de Servicio. La compañía responde únicamente frente a su cliente, sin que pueda derivarse responsabilidad de ningún tipo de SGS frente a terceros ante los que se presente el certificado o reporte derivado de su intervención. El presente documento no podrá ser alterado ni modificado, ni en su contenido ni en su apariencia. En caso de modificación del mismo, SGS se reserva las acciones legales que estime oportunas para la defensa de sus legítimos intereses."
Salvo que expresamente se indique lo contrario, los resultados se refieren única y exclusivamente a las muestras analizadas. Dichas muestras serán conservadas por un plazo que, dependiendo de sus características propias –carácter perecedero, alteración de sus propiedades por el transcurso del tiempo, etc- en ningún caso excederá de 60 días, a menos que se haya pactado expresamente con el cliente un plazo mayor.
ADVERTENCIA: Los reportes emitidos como consecuencia de inspecciones o ensayos con base en muestras, contendrán la opinión de la compañía, única y exclusivamente sobre las muestras que hayan sido objeto de inspección o ensayo, por lo que bajo ninguna circunstancia podrá interpretarse que contienen una opinión sobre la totalidad del lote del que haya sido obtenida la muestra objeto de la inspección o ensayo. La Compañía no es responsable del origen o la fuente de donde ha(n) sido extraída(s) la(s) muestra(s). "

SGS Multilab 65, Rue Ettore Bugatti BP 90014 – 76801 Saint Etienne du Rouvray cedex – France t+33(0)2 35 07 91 91 f+33(0)2 35 07 91 36 – www.fr.sgs.com/multilab
Membre du groupe SGS (Société Générale de Surveillance
Siège social : 7, rue Jean Mermoz - ZI Saint Guénault – 91080 Courcouronnes - SAS au capital de 200 000 € – Identification 393 312 913 RCS – NAF 743B



Comentarios:

El control de referencia es una sustancia conocida por su capacidad para biodegradarse y permite de validar el test (obtención de más del 90% de biodegradación en 28 días, lo que indica que el test tiene lugar en condiciones favorables).

Las líneas directrices del OCDE han establecido un umbral de 20% de biodegradación más allá del cual se considera que la sustancia es intrínsecamente biodegradable y un umbral de 70% más allá del cual se considera que la sustancia está completamente biodegradada. Para este análisis, se obtiene una biodegradación de la muestra de ensayo superior a 70% en 28 días (87%).

La muestra ALKACIDE está **"totalmente biodegradada"**, de acuerdo con los criterios del OCDE (2005).

p/o Cédric BELLIER
Responsable de Proyectos
Aline JOURDAN

"Este documento se emite por la Compañía bajo sus Condiciones Generales de Servicio, a las que se puede acceder en http://www.sgs.com/terms_and_conditions.htm. Los documentos en formato electrónico se regirán por las condiciones para documentos electrónicos a las que se puede acceder en http://www.sgs.com/en/Terms-and-Conditions/Terms-e-Document.aspx.
La responsabilidad de SGS queda limitada en los términos establecidos en las citadas condiciones Generales que resultan de aplicación a la prestación de sus servicios.
Se advierte al poseedor de este documento que la información en él recogida refleja los resultados obtenidos por la Compañía en el momento de su intervención, habiendo sido llevada a cabo exclusivamente dentro de los límites establecidos tanto en el contrato como en las Condiciones Generales de Servicio. La compañía responde únicamente frente a su cliente, sin que pueda derivarse responsabilidad de ningún tipo de SGS frente a terceros ante los que se presente el certificado o reporte derivado de su intervención. El presente documento no podrá ser alterado ni modificado, ni en su contenido ni en su apariencia. En caso de modificación del mismo, SGS se reserva las acciones legales que estime oportunas para la defensa de sus legítimos intereses."
Salvo que expresamente se indique lo contrario, los resultados se refieren única y exclusivamente a las muestras analizadas. Dichas muestras serán conservadas por un plazo que, dependiendo de sus características propias –carácter perecedero, alteración de sus propiedades por el transcurso del tiempo, etc- en ningún caso excederá de 60 días, a menos que se haya pactado expresamente con el cliente un plazo mayor.
ADVERTENCIA: Los reportes emitidos como consecuencia de inspecciones o ensayos con base en muestras, contendrán la opinión de la compañía, única y exclusivamente sobre las muestras que hayan sido objeto de inspección o ensayo, por lo que bajo ninguna circunstancia podrá interpretarse que contienen una opinión sobre la totalidad del lote del que haya sido obtenida la muestra objeto de la inspección o ensayo. La Compañía no es responsable del origen o la fuente de donde ha(n) sido extraída(s) la(s) muestra(s). "