Detergente desinfectante

Superficies altas
Listo para uso

Superficies en hospitales,
consultorios médicos
y dentales.

Manual técnico

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

Índice 1
Presentación 3
Tipo de uso 3
Especificaciones 3
Presentaciones comerciales 3
Uso 4
Informaciones reglamentarias 4
Instrucciones de empleo 4
Precauciones 5
Manutención - Almacenamiento 5
Caso de dispersión accidental – Eliminación 5
Código UFI 5
Datos físico-químicos 6
Composición 6
Características físico-químicos 6
Datos microbiológicos 7
Ensayo de determinación de la actividad bactericida 7
Ensayo de determinación de la actividad levuricida 9
Ensayo de determinación de la actividad virucida 10
Ensayo de determinación de la actividad esporicida 12

Los ensayos de microbiología y la ficha de datos de seguridad están dados a petición.

Presentación

Tipo de uso

Surfalkan SH se emplea para la limpieza y la desinfección por secado húmedo:

- de todas las superficies en hospitales, consultorios médicos y dentales.
- de las superficies de los dispositivos médicos imponentes para controlar los riesgos microbiológicos relacionados con el entorno (por ejemplo, camas, mesas de operaciones, monitores ...).

Especificaciones

- **Surf**alkan SH es una preparación detergente desinfectante.
- **Surf**alkan SH es formulado sin EDTA, con materias primas fácilmente biodegradables.
- **Surf**alkan SH es conforme a la reglamentación en vigor que concierne los productos de limpieza de los equipos y utensilios que pueden estar en contacto con productos alimenticios.
- **Surf**alkan SH es bactericida, levuricida, activo sobre el virus de la Vaccinia*, VIH, Norovirus, Rotavirus, Hepatitis B y Hepatitis C, y sobre esporas de *Clostridium difficile*.

  **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 la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC); virus de inmunodeficiencia humana (VIH); Herpesviridae (virus del herpes); Coronavirus; Influenza, rabia, rubéola, virus del sarampión; ...*

Presentaciones comerciales

Referencia	Envase	Cartonaje
Surfalkan SH		
ALKE110	Pulverizador de 750ml	12
ALKE181	5L	2

Uso

Informaciones reglamentarias

- **Surf**alkan SH es un producto biocida conforme al Reglamento 582/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo Europeo de mayo de 2012.
- **Surf**alkan SH es una preparación liquida TP2 (desinfectante para superficies que no están en contacto con productos alimenticios) y TP4 (desinfectante para superficies en contacto con productos alimenticios) para un uso profesional.
- Todas las informaciones relativas a la seguridad se encentran en la ficha de datos de seguridad disponible en el sitio web www.alkapharm.fr o a petición.

Información reglamentaria *de conformidad con el Reglamento CLP (CE) n°1272/2008 y sus* adaptaciones.	
Pictogramas de peligro	
Palabra de advertencia	Atención
Contiene	Alcohols, C9-11, ethoxylated
Indicaciones de peligro	H319 Provoca irritación ocular grave. H412 Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
Consejos de prudencia	P280 - Llevar equipo de protección para los ojos. P305+P351+P338 - 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. P337+P313 - Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. P273 - Evitar su liberación al medio ambiente. 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.

Instrucciones de empleo

Surfalkan SH es una preparación lista para uso.

1. Pulverizar hasta cubrir toda la superficie a tratar.
2. Tiempo de contacto: 5min (15min para *Clostridium difficile*).
3. Limpiar con un soporte no tejido y limpio. No enjuagar (excepto en el caso de superficies en contacto con alimentos).

El 5L se usó para rellenar la botella de 750mL.

Precauciones

- Utilizar los productos biocidas con precaución. Antes de usarlo siempre leer la etiqueta y las informaciones relativas al producto.

Manutención - Almacenamiento

- **Surf**alkan SH será mantenido en su embalaje y con su etiqueta original, describiendo su uso, sus precauciones de empleo y de seguridad.
- Conservar el recipiente bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado
- Si el producto está en condiciones de accidente, y durante mucho tiempo, cerca de una fuente de calor intenso, es mejor no volver a utilizar el producto que puede ser degradado en sus cualidades, sus propiedades y características.
- La caducidad de **Surf**alkan SH es de 3 años a partir de la fecha de fabricación. La caducidad de la solución reconstituida es de 1 mes.

Caducidad
3 años Indicado en la etiqueta en la forma : AAAA-MM (Año – Mes)

Caso de dispersión accidental – Eliminación

- Los envases vacios deben ser eliminados como residuos no peligrosos bajo la responsabilidad del titular de los residuos.
- El material derramado será absorbido por un soporte inerte.
- Los residuos recuperados serán eliminados de manera adecuada.

Código UFI

Código UFI : Y9W6-J0FE-600G-72UG

Datos físico-químicos

Composición

Composición
Preparación líquida lista para uso TP2/TP4. ETHANOL n°CAS: 64-17-5 à 3,05%. BENZALKONIUM CHLORIDE n°CAS: 68424-85-1 à 0,41%.

Características físico-químicos

Características físico-químicas	
Estado Físico	Líquido Fluido
Color	incoloro a amarillo claro
Perfume	pomelo
pH de la solución final	5,0 +/- 0,5

Datos microbiológicos

Ensayo de determinación de la actividad bactericida

Norma Europea EN 1276 (marzo 2010)

Condiciones de ensayo	
Cepa :	*Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus* *Enterococcus hirae* *Escherichia coli*
Sustancias que interfieren :	condiciones de suciedad (albúmina bovina 3g/l)
Tiempo de contacto :	30 segundos
Temperatura :	20°C

Informe de ensayo n°134-1 REA 10 del 14/09/2010
SCIENTIS

Conclusión: El producto **Surf**alkan SH, lote 750.08.10, cumple con la norma EN 1276. Tiene actividad bactericida en condiciones de suciedad, a 20°C y en 30 segundos de contacto, a la concentración de 20% (v/v).

Norma Europea EN 13697 (noviembre 2001)

Condiciones de ensayo	
Cepa :	*Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus* *Enterococcus hirae* *Escherichia coli*
Sustancias que interfieren	condiciones de suciedad (albúmina bovina 3g/l)
Tiempo de contacto :	5 minutos
Temperatura :	20°C

Informe de ensayo n°136-3 REA 10 del 21/09/2010
SCIENTIS

Conclusión : El producto **Surf**alkan SH, lote 750.08.10, cumple con la norma EN 13697. Tiene actividad bactericida a la concentración de 100% (v/v) en condiciones de suciedad, a 20°C y en 5 min de contacto.

Norma Europea EN 13697 (novembre 2001)

Condiciones de ensayo	
Cepa :	*Acinetobacter baumannii*
Sustancias que interfieren :	condiciones de suciedad (albúmina bovina 3g/l)
Tiempo de contacto :	5 minutos
Temperatura :	20°C

Informe de ensayo n°014-1 REA 11 del 14/03/2011
SCIENTIS

Conclusión: El producto **Surf**alkan SH, lote 2011.02.01.61, cumple con la norma EN 13697. Tiene actividad bactericida sobre *Acinetobacter baumannii* a la concentración de 100% (v/v) en condiciones de suciedad, a 20°C y en 5 min de contacto.

Ensayo de determinación de la actividad levuricida

Norma Europea EN 1650 (octubre 2008)

Condiciones de ensayo	
Cepa :	*Candida albicans*
Sustancias que interfieren :	condiciones de suciedad (albúmina bovina 3g/l)
Tiempo de contacto :	1 minuto
Temperatura :	20°C

Informe de ensayo n°135-2 REA 10 del 21/09/2010
SCIENTIS

Conclusión: El producto **Surf**alkan SH, lote 750.08.10, cumple con la norma EN 1650. Tiene actividad levuricida en condiciones de suciedad, a 20°C y en 1 min de contacto a la concentración de 80% (v/v).

Norma Europea EN 13697 (noviembre 2001)

Condiciones de ensayo	
Cepa :	*Candida albicans*
Sustancias que interfieren :	condiciones de suciedad (albúmina bovina 3g/l)
Tiempo de contacto :	5 minutos
Temperatura :	20°C

Informe de ensayo n°136-3 REA 10 del 21/09/2010
SCIENTIS

Conclusión: El producto **Surf**alkan SH, lote 750.08.10, cumple con la norma EN 13697. Tiene actividad levuricida sobre *Candida albicans* a la concentración de 100% (v/v) en condiciones de suciedad, a 20°C y en 5 min de contacto.

Ensayo de determinación de la actividad virucida

Ensayo sobre VIH-1 según EN 14476+A1 (enero 2007)

Condiciones de ensayo	
Cepa :	VIH-1 souche pNL4-3
Sustancias que interfieren :	condiciones de suciedad (albúmina bovina 3g/l) + 3ml eritrocitos de oveja).
Tiempo de contacto :	5 minutes
Temperatura :	20°C

Informe de ensayo n°088V53-2011 del 03/10/2011
APEX BioSolutions

Conclusión : Las pruebas realizadas en el producto **Surf**alkan SH mostró que el producto empleado a 90% tiene una actividad virucida sobre el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) de acuerdo con la metodología de la norma EN 14476 + A1 en 5 minutos de contacto a 20°C en condiciones de suciedad.

Ensayo sobre Norovirus según EN 14476+A1 (enero 2007)

Condiciones de ensayo	
Cepa :	Norovirus murin
Sustancias que interfieren :	condiciones de suciedad (albúmina bovina 3g/l) + 3ml eritrocitos de oveja).
Tiempo de contacto :	5 minutes
Temperatura :	20°C

Informe de ensayo n°306V35-2010 del 10/01/2011
APEX BioSolutions

Conclusión: Las pruebas realizadas en el producto **Surf**alkan SH mostró que el producto empleado a 90% tiene una actividad virucida sobre el Norovirus de acuerdo con la metodología de la norma EN 14476 + A1 en 5 minutos de contacto a 20°C en condiciones de suciedad.

Ensayo sobre Rotavirus según EN 14476+A1 (enero 2007)

Condiciones de ensayo	
Cepa :	Rotavirus bovin
Sustancias que interfieren :	condiciones de suciedad (albúmina bovina 3g/l) + 3ml eritrocitos de oveja).
Tiempo de contacto :	5 minutes
Temperatura :	20°C

Informe de ensayo n°326V39-2010 del 28/01/2011
APEX BioSolutions

Conclusión: Las pruebas realizadas en el producto **Surf**alkan SH mostró que el producto empleado a 90% tiene una actividad virucida sobre el Rotavirus de acuerdo con la metodología de la norma EN 14476 + A1 en 5 minutos de contacto a 20°C en condiciones de suciedad.

Ensayo sobre PRV (modelo Hepatitis B) según EN 14476+ A1 (enero 2007)

Condiciones de ensayo	
Cepa :	PRV (modelo Hepatitis B)
Sustancias que interfieren :	condiciones de suciedad (albúmina bovina 3g/l) + 3ml eritrocitos de oveja).
Tiempo de contacto :	1 minute
Temperatura :	20°C

Informe de ensayo n°S11ML1235-2P del 11/07/2011
Mikrolab

Conclusión: El desinfectante para superficies **Surf**alkan SH se utilizó sin diluir a 20 ° C en 1,5, 10 y 60 minutos de tiempo de contacto. Después de un minuto, se encontró una reducción ≥ 4log. La eficiencia se logra con **Surf**alkan SH.

Ensayo sobre BVDV (modelo Hepatitis C según EN 14476+A1 (enero 2007)

Condiciones de ensayo	
Cepa :	BVDV (modelo Hepatitis C)
Sustancias que interfieren :	condiciones de suciedad (albúmina bovina 3g/l) + 3ml eritrocitos de oveja).
Tiempo de contacto :	5 minutes
Temperatura :	20°C

Informe de ensayo n° 088V52-2011 del 20/05/2011
APEX Bio Solutions

Conclusión: Las pruebas realizadas en **Surf**alkan SH mostraron que :
- El producto **Surf**alkan SH, empleado a 90%, tiene actividad virucida en el virus de la diarrea viral bovina BVDV de acuerdo con la metodología de la norma EN 14476 + A1 durante 5 minutos de contacto a 20°C en condiciones de suciedad.
- El virus BVDV se utiliza como un modelo para probar la eficacia de los desinfectantes sobre la hepatitis C (VHC). El producto **Surf**alkan SH es eficaz contra BVDV en las condiciones del ensayo, **Surf**alkan SH es también eficacia contra el virus VHC durante 5 minutos de contacto a 20°C en condiciones de suciedad.

Norma UNI EN 16777 (enero de 2019) en el Virus de la Vaccine cepa Ankara

Condiciones del ensayo	
Cepa:	Vaccinia virus cepa Ankara
Sustancias interferentes:	Condiciones de suciedad: albúmina bovina 3g/l y eritrocitos a 3ml/l
Tiempo de contacto:	5 minutos
Temperatura:	Entre 18°C +/- 1°C y 25°C +/- 1°C

Informe de ensayo n°20/000149036 del 21/04/2020
Merieux NutriSciences – CHELAB S.R.L.

Conclusión: Según la norma UNI EN 16777: 2019, en las condiciones de las pruebas aplicadas, el producto ensayado tiene una actividad virucida (R ≥ 4) contra el Vaccinia virus.

Ensayo de determinación de la actividad esporicida

Norma Europea EN 13704 (Abril 2002)

Condiciones de ensayo	
Cepa :	*Clostridium difficile*
Sustancias que interfieren :	condiciones de suciedad (albúmina bovina 3g/l) + 3ml eritrocitos de oveja).
Tiempo de contacto :	15 minutos
Temperatura :	20°C

Informe de ensayo n°002-REA-12-ST del 12/01/.2012
SCIENTIS

Conclusión : Según la norma EN 13704, el lote 2011.06.01.61 del producto **Surf**alkan SH usado puro, tiene una actividad esporicida a partir de 15 minutos de contacto a 20°C en condiciones de suciedad en la cepa Clostridium difficile.

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	:	SURFALKAN SH
UFI	:	Y9W6-J0FE-600G-72UG
Código de producto	:	2496-003-1
Tipo de producto	:	Detergente,Productos biocidas (por ejemplo, desinfectantes o de control de plagas)
Vaporizador	:	La mezcla se usa como spray

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	:	Limpieza y desinfección de superficies mediante limpieza húmeda

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) n° 1272/2008 [CLP]

Lesiones oculares graves o irritación ocular, categoría 2	H319
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

Provoca irritación ocular grave. Tóxico 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) :

GHS07

Palabra de advertencia (CLP) : Atención

Contiene : Alcohols, C9-11, ethoxylated

Indicaciones de peligro (CLP) : H319 - Provoca irritación ocular grave.
H412 - Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Consejos de prudencia (CLP) : P280 - Llevar equipo de protección para los ojos.
P305+P351+P338 - 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.
P337+P313 - Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.
P273 - Evitar su liberación al medio ambiente.
P501 - Eliminar el contenido y el recipiente en un punto de recogida de residuos peligrosos o especiales, de acuerdo con 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) n° 1272/2008 [CLP]
Alcohols, C9-11, ethoxylated	(N° CAS) 26183-52-8	≥ 1 – < 5	Acute Tox. 4 (Oral), H302 (ATE=500 mg/kg de poids corporel) Eye Dam. 1, H318
PPG-2 METHYL ETHER sustancia a la que se aplica un límite comunitario de exposición en el lugar de trabajo	(N° CAS) 34590-94-8 (N° CE) 252-104-2 (REACH-no) 01-2119450011-60	≥ 1 – < 5	No clasificado
BENZALKONIUM CHLORIDE (Substancia activa (Biocida))	(N° CAS) 68424-85-1 (N° CE) 270-325-2 (REACH-no) 01-2119965180-41	≥ 0,1 – < 1	Acute Tox. 4 (Oral), H302 (ATE=426 mg/kg de poids corporel) Skin Corr. 1B, H314 Eye Dam. 1, H318 Aquatic Acute 1, H400 (M=10) Aquatic Chronic 1, H410

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.
Medidas de primeros auxilios en caso de contacto con la piel	:	Lavar la piel con abundante agua.
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. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.
Medidas de primeros auxilios en caso de ingestión	:	Llamar a un centro de información toxicológica o a un médico en caso de malestar.

4.2. Principales síntomas y efectos, agudos y retardados

Síntomas/efectos después del contacto con el ojo	:	Irritación de los ojos.

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.

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.

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	:	Recoger el vertido.
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 : El puesto de trabajo ha de estar bien ventilado. Evitar el contacto con los ojos y la piel. Llevar un equipo de protección individual.

Medidas de higiene : 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 : Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco.

Temperatura de almacenamiento : 5 – 35 °C

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

8.1.1 Valores límite nacionales de exposición profesional y biológicos

Ethanol (64-17-5)	
España - Valores límite de exposición profesional	
Nombre local	Etanol (Alcohol etílico)
VLA-EC (OEL STEL)	1910 mg/m³
VLA-EC (OEL STEL) [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

PPG-2 METHYL ETHER (34590-94-8)	
UE - Valor límite de exposición profesional indicativo (IOEL)	
Nombre local	(2-Methoxymethylethoxy)-propanol
IOEL TWA	308 mg/m³
IOEL TWA [ppm]	50 ppm
Notas	Skin
Referencia normativa	COMMISSION DIRECTIVE 2000/39/EC
España - Valores límite de exposición profesional	
Nombre local	Éter metílico de dipropilenglicol
VLA-ED (OEL TWA) [1]	308 mg/m³
VLA-ED (OEL TWA) [2]	50 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), VLI (Agente químico para el que la U.E. estableció en su día un valor límite indicativo).

PPG-2 METHYL ETHER (34590-94-8)	
Referencia normativa	Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España 2019. INSHT

BENZYL ACETATE (140-11-4)	
España - Valores límite de exposición profesional	
Nombre local	Acetato de bencilo
VLA-ED (OEL TWA) [1]	62 mg/m³
VLA-ED (OEL TWA) [2]	10 ppm
Referencia normativa	Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España 2019. INSHT

PINENE (80-56-8)	
España - Valores límite de exposición profesional	
Nombre local	α-pineno (monoterpeno)
VLA-ED (OEL TWA) [1]	113 mg/m³
VLA-ED (OEL TWA) [2]	20 ppm
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 (OEL TWA) [2]	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

d-Limonene (5989-27-5)	
España - Valores límite de exposición profesional	
Nombre local	d-Limoneno
VLA-ED (OEL TWA) [1]	168 mg/m³
VLA-ED (OEL TWA) [2]	30 ppm

d-Limonene (5989-27-5)	
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

8.1.2. Métodos de seguimiento recomendados

No se dispone de más información

8.1.3. Contaminantes del aire formados

No se dispone de más información

8.1.4. DNEL y PNEC

No se dispone de más información

8.1.5. Bandas de control

No se dispone de más información

8.2. Controles de la exposición

8.2.1. Controles técnicos apropiados

Controles técnicos apropiados:
El puesto de trabajo ha de estar bien ventilado.

8.2.2. Equipos de protección personal

Símbolo/s del equipo de protección personal:

8.2.2.1. Protección de los ojos y la cara

Protección ocular:			
En caso de peligro acrecentado, utilizar una pantalla para proteger el rostro. Evítese el contacto con los ojos. El uso de gafas correctoras no constituye una protección. Implementar fuentes de lavado de ojos en los talleres donde el producto se manipula de forma constante			
Tipo	**Campo de aplicación**	**Características**	**Norma**
Gafas de seguridad		con protecciones laterales	EN 166

8.2.2.2. Protección de la piel

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. Usar guantes protectores no es obligatorio. Si sus protocolos recomiendan usarlo, use guantes protectores resistentes a productos químicos adecuados que cumplan con EN374

Otra protección para la piel **Ropa de protección - selección del material:**
Evitar el contacto con la piel. Lavar todas las zonas del cuerpo que hayan estado en contacto con el producto. La ropa del personal debe lavarse con regularidad. 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. El uso de ropa protectora no es obligatorio, pero si su protocolo lo requiere, use ropa de protección química adecuada

8.2.2.3. Protección de las vías respiratorias

Protección de las vías respiratorias:
En caso de ventilación insuficiente, utilizar un aparato respiratorio adecuado

8.2.2.4. Peligros térmicos
No se dispone de más información

8.2.3. Control de la exposición ambiental

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

Otros datos:
Utilizar equipos de protección individual limpios y en buen estado. Debe verificar el estado de las protecciones antes de cada uso. Almacenar los equipos de protección individual en un lugar limpio, lejos de la zona de trabajo.

SECCIÓN 9: Propiedades físicas y químicas

9.1. Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

Forma/estado	:	Líquido
Apariencia	:	Claro.
Color	:	Incoloro a amarillo pálido.
Olor	:	Perfumes, fragancias.
Umbral olfativo	:	No hay datos disponibles
pH	:	5 – 7
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	:	65 °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	:	0,985 – 1,005
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) : No clasificado
Toxicidad aguda (cutánea) : No clasificado
Toxicidad aguda (inhalación) : No clasificado

BENZALKONIUM CHLORIDE (68424-85-1)	
DL50 oral	426 mg/kg de peso corporal
DL50 vía cutánea	2300 mg/kg de peso corporal

PPG-2 METHYL ETHER (34590-94-8)	
DL50 oral rata	> 5000 mg/kg de peso corporal Animal: rat, Guideline: OECD Guideline 401 (Acute Oral Toxicity)
DL50 cutánea rata	> 19020 mg/kg de peso corporal Animal: rat, Guideline: OECD Guideline 402 (Acute Dermal Toxicity)
DL50 cutáneo conejo	9510 mg/kg de peso corporal Animal: rabbit, Animal sex: male, Guideline: OECD Guideline 402 (Acute Dermal Toxicity)

Corrosión o irritación cutáneas : No clasificado
pH: 5 – 7
Lesiones oculares graves o irritación ocular : Provoca irritación ocular grave.
pH: 5 – 7
Sensibilización respiratoria o cutánea : No clasificado
Mutagenicidad en células germinales : No clasificado
Carcinogenicidad : No clasificado

Toxicidad para la reproducción : No clasificado

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

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

PPG-2 METHYL ETHER (34590-94-8)	
NOAEL (oral, rata, 90 días)	1000 mg/kg de peso corporal Animal: rat, Guideline: other:KANPOGYO No.700, YAKUHATSU No. 1039.61, and KIKYKU No. 1014.
NOAEL (cutáneo, rata/conejo, 90 días)	2850 mg/kg de peso corporal Animal: rabbit, Animal sex: male, Guideline: OECD Guideline 411 (Subchronic Dermal Toxicity: 90-Day Study)

Peligro por aspiración : No clasificado

SURFALKAN SH	
Vaporizador	La mezcla se usa como spray

SECCIÓN 12: Información ecológica

12.1. Toxicidad

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

Alcohols, C9-11, ethoxylated (26183-52-8)	
CE50 - Crustáceos [1]	15 mg/l (OECD 202)
CE50 72h - Algas [1]	19,6 mg/l (OECD 201)

BENZALKONIUM CHLORIDE (68424-85-1)	
CL50 - Peces [1]	0,28 mg/l
CL50 - Peces [2]	0,85 mg/l Oncorhynchus mykiss (OECD 203)
CE50 - Crustáceos [1]	0,016 mg/l Daphnia magna
CE50 - Otros organismos acuáticos [1]	waterflea
CE50 - Otros organismos acuáticos [2]	0,049 mg/l
CE50 72h - Algas [1]	0,02 mg/l Selenastrum capricornutum (OECD 201)

PPG-2 METHYL ETHER (34590-94-8)	
CL50 - Peces [1]	> 1000 mg/l Test organisms (species): Poecilia reticulata
CE50 - Otros organismos acuáticos [1]	1930 mg/l Test organisms (species): other aquatic crustacea:Acartia tonsa
CE50 72h - Algas [1]	> 969 mg/l Test organisms (species): Pseudokirchneriella subcapitata (previous names: Raphidocelis subcapitata, Selenastrum capricornutum)
CE50 96h - Algas [1]	> 969 mg/l Test organisms (species): Pseudokirchneriella subcapitata (previous names: Raphidocelis subcapitata, Selenastrum capricornutum)
LOEC (crónico)	0,5 mg/l Test organisms (species): Daphnia magna Duration: '22 d'
NOEC (crónico)	≥ 0,5 mg/l Test organisms (species): Daphnia magna Duration: '22 d'

12.2. Persistencia y degradabilidad

SURFALKAN SH	
Persistencia y degradabilidad	Tensioactivos en esta preparación cumplan con las normas de biodegradabilidad, tal como se definen en el Reglamento (CE) n ° 648/2004 sobre detergentes. Los datos para justificar esta afirmación están a disposición de las autoridades competentes de los Estados miembros y se pondrá a disposición a petición suya, bien a petición de un fabricante de detergentes.

Alcohols, C9-11, ethoxylated (26183-52-8)	
Persistencia y degradabilidad	No establecido.

12.3. Potencial de bioacumulación

Alcohols, C9-11, ethoxylated (26183-52-8)	
Potencial de bioacumulación	No establecido.

BENZALKONIUM CHLORIDE (68424-85-1)	
Coeficiente de partición n-octanol/agua (Log Pow)	2,88 (OECD 107)

12.4. Movilidad en el suelo

No se dispone de más información

12.5. Resultados de la valoración PBT y mPmB

SURFALKAN SH
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	
Alcohols, C9-11, ethoxylated (26183-52-8)	PBT: no relevante – no se requiere registro mPmB: no relevante – no se requiere registro

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 la normativa oficial.

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

En conformidad con ADR / IMDG / IATA / ADN / RID

ADR	IMDG	IATA	ADN	RID
14.1. Número ONU				
No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable
14.2. Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas				
No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable
14.3. Clase(s) de peligro para el transporte				
No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable
14.4. Grupo de embalaje				
No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable

14.5. Peligros para el medio ambiente				
No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable
No se dispone de información adicional				

14.6. Precauciones particulares para los usuarios

Transporte por vía terrestre
No aplicable

Transporte marítimo
No aplicable

Transporte aéreo
No aplicable

Transporte por vía fluvial
No aplicable

Transporte ferroviario
No aplicable

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. Normativa de la UE

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
No contiene ninguna sustancia sujeta al Reglamento (UE) n° 649/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 4 de julio de 2012, relativo a la exportación e importación de productos químicos peligrosos.
No contiene ninguna sustancia sujeta al Reglamento (UE) n° 2019/1021 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de junio de 2019, sobre contaminantes orgánicos persistentes

Perfumes alergénicos > 0,01%:
LINALOOL LIMONENE

Reglamento sobre detergentes : Etiquetado del contenido:	
Componente	**%**
tensioactivos no iónicos	<5%
desinfectantes	
perfumes	
LINALOOL	
LIMONENE	

Reglamento (UE) n° 528/2012 relativo a la comercialización y el uso de biocidas
Este producto contiene productos biocidas

Tipo de producto (Biocida)	:	2 - Desinfectantes y alguicidas no destinados a la aplicación directa a personas o animales, 4 - Alimentos y piensos
Número de autorización	:	
Contiene	:	BENZALKONIUM CHLORIDE (0,41 %); Ethanol (3,05 %)

15.1.2. Normativas 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:
Identificación de los peligros. Composición/información sobre los componentes. Información relativa al transporte. Nomenclatura regulatoria. Installations classées.

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. 4 (Oral)	Toxicidad aguda (oral), categoría 4
Aquatic Acute 1	Peligroso para el medio ambiente acuático — Peligro agudo, categoría 1
Aquatic Chronic 1	Peligroso para el medio ambiente acuático — Peligro crónico, categoría 1
Eye Dam. 1	Lesiones oculares graves o irritación ocular, categoría 1
Skin Corr. 1B	Irritación o corrosión cutáneas, categoría 1, subcategoría 1B
H302	Nocivo en caso de ingestión.
H314	Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
H318	Provoca lesiones oculares graves.
H319	Provoca irritación ocular grave.
H400	Muy tóxico para los organismos acuáticos.
H410	Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
H412	Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

La clasificación cumple : ATP 12

Ficha de datos de seguridad (FDS), UE

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.

Sodel
HYGIÈNE • DÉSINFECTION • SURODORANTS
Certifié ISO 9001 / 13485
ECOLABEL / ECOCERT

Cibler le risque infectieux
Alkapharm
La marque de la division Santé Sodel

ATTESTATION D'ÉQUIVALENCE

CERTIFICATE OF EQUIVALENCE

CERTIFICADO DE EQUIVALENCIA

Je soussigné, Séverine HUVET, Chargée d'affaires réglementaires, atteste par la présente que les rapports d'essais établis avant 2018 par ou au nom de la société ALKAPHARM peuvent être conservés pour la mise sur le marché des produits **à marque Alkapharm** par la société SODEL.
La composition, la méthode de fabrication et l'usage revendiqué de ces produits ne sont pas modifiés.

*I, Séverine HUVET, Regulatory Affairs Officer, hereby certify that tests reports written before 2018 by or on behalf of ALKAPHARM may be retained for placing on the market of **ALKAPHARM branded** products by SODEL.*
The composition, the method of manufacture and the claimed use of these products are not modified.

Yo, Séverine HUVET, Oficial de Asuntos Regulatorios, certifico que los informes de pruebas escritos antes de 2018 por ALKAPHARM pueden conservarse para la comercialización en el mercado de productos de **marca ALKAPHARM** por parte de SODEL.
La composición, el método de fabricación y el uso reivindicado de estos productos no están modificados.

Pour valoir ce que de droit.

To argue that right.

Para hacer valer ese derecho.

Lisieux,
Le 30 septembre 2018 / September 30, 2018 / 30 de septiembre de 2018

Séverine HUVET
Chargée d'Affaires Réglementaires

INFORME DE ENSAYO
134-1 REA 10 ES

Seule la version française fait foi / Sólo la versión francesa da fe

Ensayo según la norma NF EN 1276 (Marzo 2010)

Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida de los antisépticos y de los desinfectantes químicos utilizados en el entorno de la industria agroalimentaria, en la industria, en entornos domésticos y en colectividades.

Métodos de ensayo y prescripciones (Fase 2, etapa 1)

I. Identificación de la muestra

Denominación del producto:	**Surfalkan SH**
Número de lote:	750.08.10
Fabricante:	ALKAPHARM Parc Biocitech – 102 Avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE FRANCIA
Fecha de recepción:	27/08/10
Condiciones de almacenamiento:	A temperatura ambiente
Diluyente del producto recomendado por el fabricante:	No especificado
Sustancia(s) activa(s):	No especificada
Aspecto del producto:	Líquido transparente

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. Principio del ensayo

El ensayo según la norma NF EN 1276 (2010) tiene como objetivo poner en evidencia una reducción del número de microorganismos, cuando éstos son puestos en contacto con el producto del ensayo, en las condiciones especificadas a continuación.

Este ensayo realizado en suspensión permite determinar una actividad bactericida si la tasa de reducción es de 10^5 o más. La concentración bactericida determinada de esta manera es apropiada para situaciones prácticas de uso.

III. Resultados del ensayo

NF EN 1276 (2010)	**Surfalkan SH**	Lote : 750.08.10

Periodo del ensayo: 27/08/2010 al 13/09/2010

Diluyente del producto: Agua destilada

Método por dilución -neutralización

Neutralizante: Diluyente Farmacopea Europea + Neutralizante (VWR)

Recuento en profundidad

Agar para recuento: T.S.A.

Temperatura de ensayo: 20°C

Temperatura de incubación: 37°C

Tiempo de contacto adicional: **30 segundos**

Microorganismos del ensayo:

Pseudomonas aeruginosa	CIP 103467
Escherichia coli	CIP 54.127
Enterococcus hirae	CIP 58.55
Staphylococcus aureus	CIP 4.83

Sustancias interferentes: **Condiciones de suciedad** (albúmina bovina 3 g/l)

Aspecto de las diluciones del producto: Incoloras

Estabilidad de las mezclas: Mezclas estables

a. Validación y testigos

Cepa (Colección y número)	Suspensión bacteriana de validación (N_{v0})	Testigo de condiciones experimentales (A)	Validación del neutralizante (B)	Validación del método (C)
Pseudomonas aeruginosa CIP 103467	107,5	99,5	98	90,5
Escherichia coli CIP 54.127	66	58	59	40,5
Staphylococcus aureus CIP 4.83	37	32,5	30,5	0
Enterococcus hirae CIP 58.55	73,5	57,5	50,5	48

Criterios de validación :
N_{vo} está comprendido entre 30 y 160 UFC/ml
A, B y C son superiores o iguales a 0,5 x N_{v0}

El método es validado en las condiciones de la ensayo únicamente para las cepas *Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus hirae y Escherichia coli.*

b. Validación y testigos

Método por dilución -neutralización

Neutralizante: Lécithine (3g / l); Polysorbate 80 (30g / l); Thiosulfate de sodio (5g / l); L-histidine (1g / l); saponina (30g / l); Tryptone clorura de sodio (qsp 1l)

Cepa (Colección y número)	Suspensión bacteriana de validación (N_{v0})	Testigo de condiciones experimentales (A)	Validación del neutralizante (B)	Validación del método (C)
Staphylococcus aureus CIP 4.83	37	28,5	30	0

El método de ensayo por dilución-neutralización no es validado con esto que neutraliza aconsejado por la norma para la cepa Staphylococcus aureus, las ensayos pues son realizadas por filtración.

c. Método por filtración

Líquido de enjuague: agua PPI + 0,5% Tween 80

Volumen de enjuague : 150 ml

Cepa (Colección y número)	Suspensión bacteriana de validación (N_{v0})	Testigo de condiciones experimentales (A)	Validación del neutralizante (B)	Validación del método (C)
Staphylococcus aureus CIP 4.83	77	79,5	74	79

Criterios de validación :
N_{vo} está comprendido entre 30 y 160 UFC/ml
A, B y C son superiores o iguales a 0,5 x N_{v0}

El método por filtración valida en las condiciones del ensayo.

d. Suspensión de ensayo

Cepa (Colección y número)	Suspensión bacteriana de ensayo (N)	lg N	N_0 (= N / 10)	lg N_0
Pseudomonas aeruginosa CIP 103467	$4,3 \times 10^8$	8,6	$4,3 \times 10^7$	7,6
Escherichia coli CIP 54.127	$2,4 \times 10^8$	8,4	$2,4 \times 10^7$	7,4
Staphylococcus aureus CIP 4.83	$2,8 \times 10^8$	8,5	$2,8 \times 10^7$	7,5
Enterococcus hirae CIP 58.55	$2,5 \times 10^8$	8,4	$2,5 \times 10^7$	7,4

e. Ensayo

Cepa (Colección y número)		Número de células viables (Na) e índice de reducción (R) a las concentraciones de producto testadas				
		1% (v/v)	10% (v/v)	20% (v/v)	40% (v/v)	80% (v/v)
Pseudomonas aeruginosa CIP 103467	Na	>3300	>3300	250	<140	<140
	lg Na	>3,5	>3,5	2,4	<2,2	<2,2
	lg R	**<4,1**	**<4,1**	**5,2**	**>5,4**	**>5,4**
Escherichia coli CIP 54.127	Na	>3300	<140	<140	<140	<140
	lg Na	>3,5	<2,2	<2,2	<2,2	<2,2
	lg R	**<3,9**	**>5,2**	**>5,2**	**>5,2**	**>5,2**
Staphylococcus aureus CIP 4.83	Na	>1650	<140	<140	<140	<140
	lg Na	>3,2	<2,2	<2,2	<2,2	<2,2
	lg R	**<4,3**	**>5,3**	**>5,3**	**>5,3**	**>5,3**
Enterococcus hirae CIP 58.55	Na	>3300	<140	<140	<140	<140
	lg Na	>3,5	<2,2	<2,2	<2,2	<2,2
	lg R	**<3,9**	**>5,2**	**>5,2**	**>5,2**	**>5,2**

$\lg R = \lg N_0 - \lg Na$

Una concentración es bactericida si $\lg R \geq 5$

IV. Conclusión

El producto **Surfalkan SH, lote 750.08.10**, es conforme a la norma NF EN 1276. Presenta una actividad bactericida en condiciones de suciedad, a 20°C y con 30 segundos de contacto a la concentración de 20% (v/v).

Romainville, el 31 de mayo de 2011

Corinne BENOLIEL
Doctora en farmacia
Directora científica

scientis

INFORME DE ENSAYO
135-2REA 10 ES
Seule la version française fait foi / Sólo la versión francesa da fe

Ensayo según la norma NF EN 1650 (Octubre 2008)

Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad fungicida o levuricida de los antisépticos y de los desinfectantes químicos utilizados en el entorno de la industria agroalimentaria, en la industria, en entornos domésticos y en colectividades.

Métodos de ensayo y prescripciones (Fase 2, etapa 1)

Ensayo parcial para *Candida albicans*

I. Identificación de la muestra

Denominación del producto:	**Surfalkan SH**
Número de lote:	750.08.10
Empresa: :	ALKAPHARM Parc Biocitech - 102 avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE FRANCIA
Fecha de recepción:	27/08/10
Condiciones de almacenamiento:	A temperatura ambiente
Diluyente del producto recomendado por el fabricante:	No especificado
Sustancia(s) activa(s):	No especificada
Aspecto del producto:	Liquido transparente

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. Principio del ensayo

El ensayo según la norma NF EN 1650 (2008) tiene como objetivo poner en evidencia una reducción del número de microorganismos, cuando éstos son puestos en contacto con el producto del ensayo, en las condiciones especificadas a continuación.

Este ensayo realizado en suspensión permite determinar una actividad fungicida o levuricida si la tasa de reducción es de 10^4 o más.

III. Resultados del ensayo

NF EN 1650 (2008)	**Surfalkan SH**	Lote : 750.08.10

Periodo del ensayo: 17/09/10 al 20/09/10

Diluyente del producto: Agua destilada

Método por dilución -neutralización

Neutralizante: Diluyente Farmacopea Europea + Neutralizante (VWR)

Recuento en profundidad

Gélose de dénombrement : Agar Malta

Temperatura de ensayo: 20°C

Temperatura de incubación: 30°C

Microorganismos del ensayo: *Candida albicans* ATCC 102.31

Tiempo de contacto adicional: **1 minuto**

Sustancias interferentes: **Condiciones de suciedad** (albúmina bovina 3 g/l)

Aspecto de las diluciones del producto: Incoloras

Estabilidad de las mezclas: Mezclas estables

a. Validación y testigos

Cepa (Colección y número)	Suspensión de validación (N_v)	Suspensión de validación (N_{v0})	Testigo de condiciones experimentales (A)	Testigo de neutralizante (B)	Validación del método (C)
Candida albicans ATCC 102.31	500	50	51,5	52,5	60,5

N_{v0} está comprendido entre 30 y 160 UFC/ml

A, B y C son superiores o iguales a 0,5 x N_{v0}

El método se valida en las condiciones del ensayo.

b. Suspensión de ensayo

Cepa (Colección y número)	Suspensión de ensayo (N)	lg N	N_0 (= N / 10)	lg N_0
Candida albicans ATCC 102.31	$1,9 \times 10^7$	7,3	$1,9 \times 10^6$	6,3

N está comprendido entre $1,5 \times 10^7$ y $5,0 \times 10^7$ UFC/ml
N_0 está comprendido entre $1,5 \times 10^6$ y $5,0 \times 10^6$ UFC/ml

c. Ensayo

		Número de células viables (Na) e índice de reducción (R) a las concentraciones de producto testadas				
Cepa (Colección y número)		1%(v/v)	10%(v/v)	20% (v/v)	40% (v/v)	80%(v/v)
Candida albicans ATCC 102.31	Na	>3300	>3300	555	260	<140
	lg Na	>3,5	>3,5	2,7	2,4	<2,2
	lg R	**<2,8**	**<2,8**	**3,6**	**3,9**	**>4,1**

$\lg R = \lg N_0 - \lg Na$

Una concentración es levuricida si $\lg R \geq 4$

IV. Conclusión

El producto **Surfalkan SH**, **lote 750.08.10**, es conforme a la norma NF EN 1650. Presenta una actividad levuricida en condiciones de suciedad, a 20°C y con 1 minuto de contacto a la concentración de 80% (v/v).

Romainville, el 31 de mayo de 2011

Corinne BENOLIEL
Doctora en farmacia
Directora científica

scientis

INFORME DE ENSAYO
136-3REA10 ES
Seule la version française fait foi / Sólo la versión francesa da fe

Ensayo según la norma NF EN 13697 (Noviembre 2001)

Ensayo cuantitativo de superficie no porosa para la evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de los desinfectantes químicos utilizados en el entorno de la industria agroalimentaria, en la industria, en entornos domésticos y en colectividades.

Método de ensayo sin acción mecánica y prescripciones (Fase 2, Etapa 2)

I. Identificación de la muestra

Denominación del producto:	**Surfalkan SH**
Número de lote:	750.08.10
Fabricante:	ALKAPHARM Parc Biocitech - 102 avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE FRANCIA
Fecha de recepción:	27/08/10
Condiciones de almacenamiento:	A temperatura ambiente y resguardado de la luz
Diluyente del producto recomendado por el fabricante:	No especificado
Sustancia(s) activa(s):	No especificada
Aspecto del producto:	Líquido transparente

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. Principio del ensayo

El ensayo según la norma NF EN 13697 (2001) tiene como objetivo poner en evidencia una reducción del número de microorganismos, cuando éstos son puestos en contacto con el producto del ensayo, en las condiciones especificadas a continuación.

Este ensayo realizado sobre discos de acero inoxidable permite determinar una actividad bactericida en el entorno de aplicación, si la tasa de reducción es de 10^4 o más y/o una actividad fungicida en el entorno de aplicación, si la tasa de reducción es de 10^3 o más.

III. Resultados del ensayo

NF EN 13697 (2001)	**Surfalkan SH**	Lote : 750.08.10

Periodo del ensayo: 7/09/10 al 17/09/10

Diluyente del producto: Agua destilada

Neutralizante: Diluyente Farmacopea Europea + Neutralizante (VWR)

Cepas: *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467

Staphylococcus aureus	CIP 4.83
Enterococcus hirae	CIP 58.55
Escherichia coli	CIP 54.127
Candida albicans	ATCC 10231

Recuento en profundidad

Agar para recuento: Bactéries: T.S.A.
Candida albicans : Agar Malta

Temperatura de ensayo: 20°C

Temperatura de incubación: 37°C (30°C para *Candida albicans*)

Sustancias interferentes: **Condiciones de suciedad** (albúmina bovina 3 g/l)

Tiempo de contacto: **5 minutos**

Aspecto de las diluciones del producto: Incoloras

Estabilidad de las mezclas: Mezclas estables

a. Suspensión de ensayo

Cepa (Colección y número)	*Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467	*Staphylococcus aureus* CIP 4.83	*Enterococcus hirae* CIP 58.55	*Escherichia coli* CIP 54.127	*Candida albicans* ATCC 10231
N	7,7	6,9	7,3	7,5	6,5

b. Validación y testigos

Cepa (Colección y número)	Control del agua Nc	Testigo de neutralización NC	Ensayo de neutralización NT
Pseudomonas aeruginosa CIP 103467	7,0	7,0	6,9
Staphylococcus aureus CIP 4.83	6,8	6,9	6,8
Enterococcus hirae CIP 58.55	6,9	6,9	6,9
Escherichia coli CIP 54.127	6,4	6,3	6,3
Candida albicans ATCC 10231	5,8	5,8	5,8

N-NC es inferior o igual a $2\log_{10}$
NC-NT es inferior o igual a ±0,3
N-Nc es inferior o igual a $2\log_{10}$

El método se valida en las condiciones del ensayo

c. Ensayo

Cepa (Colección y número)		Número de células viables (Na) e índice de reducción (ME) a las concentraciones de producto testadas				
		1% (v/v)	10% (v/v)	25% (v/v)	50% (v/v)	100% (v/v)
Pseudomonas aeruginosa CIP 103467	Nd	>5,5	2,7	<0,1	<0,1	<0,1
	Nts	>100	0	0	0	0
	ME	**<1,5**	**4,3**	**>6,9**	**>6,9**	**>6,9**
Staphylococcus aureus CIP 4.83	Nd	/	3,6	>5,5	>5,5	2,6
	Nts	/	0	0	0	0
	ME	**/**	**3,2**	**<1,3**	**<1,3**	**4,2**
Enterococcus hirae CIP 58.55	Nd	>5,5	4,7	4,7	4,3	2,4
	Nts	>100	0	0	0	0
	ME	**<1,4**	**2,2**	**2,2**	**2,6**	**4,5**
Escherichia coli CIP 54.127	Nd	4,8	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Nts	0	0	0	0	0
	ME	**1,6**	**>6,3**	**>6,3**	**>6,3**	**>6,3**
Candida albicans ATCC 10231	Nd	>5,5	2,0	2,7	2,2	<0,1
	Nts	20	0	0	0	0
	ME	**<0,3**	**3,8**	**3,1**	**3,6**	**>5,7**

ME = Nc - Nd

Una concentración es bactericida si ME ≥ 4

Una concentración es levuricida si ME ≥ 3

IV. Conclusión

El producto **Surfalkan SH, lote 750.08.10**, es conforme a la norma EN 13697. Presenta una actividad bactericida y una actividad levuricida sobre la *Candida albicans* a la concentración de 100% (v/v), en presencia de condiciones de suciedad, a 20°C y con 5minutos de contacto.

Romainville, el 31 de mayo de 2011

Corinne BENOLIEL
Doctora en farmacia
Directora científica

scientis

TEST REPORT
014-1REA11 AN

Seule la version française fait foi / Only the French version is valid

Test according to the NF EN 13697 (November 2001) standard

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

Partial test on the strain *Acinetobacter baumannii*

I. Sample identification

Product name:	**Surfalkan SH**
Batch:	2011.02.01.61
Manufacturer:	ALKAPHARM Parc Biocitech – 102 Avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE
Date of receipt:	08/03/2011
Storage conditions:	At ambient temperature and keep away from light
Product diluent recommended by the manufacturer:	Not specified
Active substance(s):	Not specified
Appearance of the product:	Clear liquid

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. Test principle

The purpose of the test according to the NF EN 13697 (2001) standards is to draw attention to a reduction in the number of microorganisms, when these come into contact with the test product under conditions specified below.

This test conducted on stainless steel discs is used to ascertain a bactericidal activity if the reduction rate is 10^4 or more and/or a fungicidal activity if the reduction rate is 10^3 or more. The bactericidal and/or fungicidal concentration thus ascertained suits practical use scenarios

III. Test results

NF EN 13697 (2001)	**Surfalkan SH**	Batch: 2011.02.01.61

Test period:	08/03/2011 to 10/03/2011
Product diluent:	Distilled water
Neutralising agent:	Pharmacopoeia diluent + Neutralising agent (VWR)
Microorganism test:	*Acinetobacter baumannii* CIP 103572
In-depth count	
Culture media:	T.S.A
Test temperature:	20°C
Incubation temperature:	37°C
Interfering substances:	**Dirty conditions** (Bovin albumin 3 g/l)
Additional contact time:	**5 minutes**
Product' dilution appearance:	Colourless
Mix stability:	Stable

a. Suspensions for test, validation and controls

Strain (Collection et number)	N	Water control Nc	Neutralisation control NC	Neutralisation test NT
Acinetobacter baumannii CIP 103572	7,3	6,6	6,7	6,7

N-NC is not greater than $2\log_{10}$ orders
NC-NT is not greater than ±0,3
N-Nc is not greater than $2\log_{10}$ orders

The method is validated under test conditions.

b. Test

		Number of viable cells (Nd) and reduction rate (ME) in tested product concentrations			
Strain (Collection et number)		10% (v/v)	25% (v/v)	50% (v/v)	100% (v/v)
Acinetobacter baumannii CIP 103572	Nd	>5,5	4,3	3,1	<0,1
	Nts	15	26	4	3
	ME	**<1,1**	**2,3**	**3,5**	**>6,5**

ME = Nc - Nd
A concentration is bactericidal if ME ≥4

IV. Conclusion

The product **Surfalkan SH, batch 2011.02.01.61,** is compliant with the NF EN 13697 standard. It shows a bactericidal activity on the strain *Acinetobacter baumannii* at 100% (v/v), in dirty conditions, at 20°C and in 5 minutes contact time.

Romainville, December 02nd, 2013

Corinne BENOLIEL
Doctor of Pharmacy
Scientific Director

INFORME DE ANÁLISIS

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD VIRUCIDA EN CONEXIÓN CON EL NOROVIRUS MURINO DEL PRODUCTO SURFALKAN SH

Para: **ALKAPHARM**
PARC BIOCITECH
102 AVENUE GASTON ROUSSEL
93230 ROMAINVILLE
FRANCIA

Fecha de pedido de la prueba: 23/11/2010

Referencias de los informes de análisis: n°306V35-2010

PRUEBAS DE VIRUCIDA:

Según la metodología de la norma europea NF EN 14476+A1 (enero 2007) – antisépticos y desinfectantes químicos – pruebas virucidas cuantitativos de suspensión para los desinfectantes y antisépticos utilizados en la medicina humana.

Pruebas sobre el norovirus murino de una muestra de producto desinfectante listo para el empleo, el SURFALKAN SH.

Este informe contiene 13 paginas et solo incluye las muestras utilizadas.

Fecha de expediente: 10/01/2011

Stephanie MOROT-BIZOT
Doctor en microbiología
Encargada del Informe

Professor Georges HERBEIN
Professor en Universidades de Médicos en Hospitales
Experto científico

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 €

ÍNDICE

1. LABORATORIO DIRIGIENDO LAS PRUEBAS
2. IDENTIFICACIÓN COMPLETA DE LAS MUESTRAS
3. CONDICIONES EXPERIMENTALES
4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO
5. PRUEBAS ACTUALES – CALCULO DE LA ACTIVIDAD VIRUCIDA
6. VERIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA
7. CONCLUSIONES
8. APÉNDICES TÉCNICOS

1 LABORATORIO DIRIGIENDO LAS PRUEBAS

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 Besançon

2 IDENTIFICACIÓN COMPLETA DE LAS MUESTRAS

Productos SURFALKAN SH

Numero de lote: 831.11.10
Fecha de caducidad: no especificado
Fabricante: no especificado
Fecha de fabricación: no especificado
Condiciones de almacenaje: según condiciones indicadas por el fabricante
Componentes activos: no especificado
Aspecto: límpido, incoloro.
Diluyente preconizado por el fabricante: ninguno (listo para uso)
Fecha de recepción en el laboratorio: 01/12/2010
Periodo de la prueba: del 06/12/2010 al 07/01/2011

3 CONDICIONES EXPERIMENTALES

Fecha de pruebas: del 06/12/2010 al 07/01/2011

Temperatura de las pruebas: 20°C ± 1°C
Método de titulación: virus titulado en log DICT $_{50}$
Tiempo de contacto: 5 minutos
Diluyente del producto utilizado en las pruebas: agua destilada estéril
Cepa de virus probado: norovirus murino MNV-1, cepa S99, cultivado en células RAW 264.7, a 37°C, a menos de 5% CO2
Substancias interferentes: 3 g/l de suero albumino bovino + 3 ml eritrocitos de oveja
Estabilidad del producto en presencia de substancias interferentes: nubloso opaco blanco
Técnica de paro de la acción virucida: con frío

Titulación viral:

Titulación por efecto citopático de la suspensión viral de la prueba del norovirus murino (calculado según el método de Spearman-Kärber) = 8,75 log $DICT_{50}$.

4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

a) Metodología

El producto SURFALKAN SH ha sido probado sobre una cultura de células RAW 264.7 y una ligera citotoxicidad fue observada (hasta dilución 10^{-3}).

b) Sensibilidad de las células a los virus

Para cada una de las suspensiones virales utilizadas para estas pruebas, las titulaciones comparativas de virus fueron hechos en células tratadas o no con el producto.

	Titulación del virus (log $DICT_{50}$)		
Dilución del producto	Suspensión viral en células no tratadas	Suspensión viral en células tratadas	**Diferencia de titulación viral (log $DICT_{50}$)**
SURFALKAN SH 10^{-4}	8,875	8	**0,875**

La diferencia de la titulación viral debe ser inferior a 1,0 log. El producto SURFALKAN SH probado en la concentración indicada no muestra influencias sobre el método de titulación del norovirus murino.

c) Validación de la eficacia del termino de actividad del producto SURFALKAN SH :

Concentración del producto	**Substancias interferentes**	**Titulación de virus (log $DICT_{50}$)**	**Diferencia con la suspensión viral de la prueba**
SURFALKAN SH 100 %	3 g/l BSA	Prueba 1 : 8,375	0,375
		Prueba 2 : 8,25	0,50
	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos de oveja	Prueba 1 : 8,875	0,125
		Prueba 2 : 8,5	0,25

El método esta validado si la diferencia de la titulación viral es $\leq$ 0,5 log.

d) Prueba de inactivación de referencia

	Titulación del virus (log $DICT_{50}$)	**Reducción de la titulación viral (log $DICT_{50}$)**
Suspensión viral piloto	8,375	
En formaldehído 1,4%		
Prueba de inactivación 5 min	7	1,375
Prueba de inactivación 15 min	6,125	2,25
Prueba de inactivación 30 min	6	**2,375**

La validación de las pruebas esta efectiva si la reducción de la titulación viral entre la suspensión piloto y la suspensión sometida al formaldehído se compone entre -0,5 y -2,5 log después de 30 min. La reducción es de 2,375 log después de 30 min y las condiciones de la norma están rellenadas.

5 PRUEBAS ACTUALES – CALCULO DE LA ACTIVIDAD VIRUCIDA

Titulación de la suspensión viral utilizada para el cálculo de la actividad virucida.

Prueba 1

La suspensión viral de prueba a una concentración de 8,875 log $DICT_{50}$ antes de pruebas para el producto SURFALKAN SH a 100 %, de 8 log $DICT_{50}$ para el producto probado a 90 % y de 8,5 log $DICT_{50}$ para el producto a 50 %.

PRODUCTO	Concentración (v/v)	Tiempo de contacto	Temperatura de contacto	Titulación después de prueba (log $DICT_{50}$)	Reducción de la titulación viral
SURFALKAN SH	100 %	5 min	20°C	4,50	**4,375**
	90%	5 min	20°C	4,625	**3,375**
	50 %	5 min	20°C	8,00	**0,50**

Prueba 2

La suspensión viral de prueba con una concentración de 8,5 log $DICT_{50}$ antes de pruebas para el producto SURFALKAN SH à 100 %.

PRODUCTO	Concentración (v/v)	Tiempo de contacto	Temperatura de contacto	Titulación después de pruebas (log $DICT_{50}$)	Reducción de la titulación viral
SURFALKAN SH	100 %	5 min	20°C	4,375	**4,125**

Las concentraciones probadas del producto son virucidas si la reducción de la titulación viral es superior o igual a 4,0 log.

6 VERIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA

Las pruebas realizadas satisfacen a los criterios de validación por las siguientes razones:

- La titulación de la suspension viral de prueba esta suficientemente importante para permitir una observación de reducción de 4 log después de pruebas; es de 8,75 log $DICT_{50}$ para el norovirus murino.

- La diferencia des las titulaciones entre piloto viral y virus de referencia en la prueba de inactivación esta entre -0.5 y - 2.5 después de 30 minutos; la diferencia es de 2,375 log después de 30 min de inactivación por el formaldehído para el norovirus murino.

- El producto probado no afecta sensiblemente la morfología de las células.

- Les condiciones de pruebas (sucios) (eritrocitos de oveja + BSA) no afectan la infección potencial del virus.

- El producto probado no reduce la sensibilidad de las células al norovirus murino. Las titulaciones de virus puestos en contacto con las células tratadas con el producto y las células no tratadas tienen una diferencia inferior a 1,0 log (la diferencia es de 0,875 log).

- La diferencia de titulación entre la prueba de suspension viral y el control de eficacia del paro de actividad del desinfectante es inferior a 0,5 log (0,125 log $DICT_{50}$ prueba 1, et 0,25 log $DICT_{50}$ prueba 2)

7 CONCLUSIONES

Las pruebas realizadas en el producto SURFALKAN SH han demostrado:

- que el producto **SURFALKAN SH** **utilizado puro para una actividad virucida en el norovirus murino,** según la metodología de la norma NF EN 14476+A1, **para 5 minutos de contacto a 20°C, en condiciones de suciedad, tiene una actividad virucida.**

APÉNDICE 1

Linaje celular utilizado: células RAW 264.7 (ATCC TIB-71)

Cepa viral: norovirus murino, cepa S99 (lote n° 4/200409/220409- Friedrich Loeffler Institut)

Tapones y centros de cultura:

- Tapón PBS: cloruro de sodio, Panreac, ref. 141659.1211, lote n° 0000204679; fosfato de sodio dibásico, Sigma Aldrich, ref. S5136, lote n° BCBC7067V; fosfato de sodio monobásico, Sigma Aldrich, ref. S5011, lote n° 1019K01021V
- Medio MEM, Sigma Aldrich, ref. M0268, lote n° 040M8301
- Medio DMEM, Sigma Aldrich, ref. D6546, lote n° RNBB3646
- Suero fetal de ternero, Sigma Aldrich, ref. F7524, lote n° 078K3396

Reactivos:

- Suero de albúmina bovino en polvo, Sigma Aldrich, ref. A7906, lote n° 078K0729
- Sangre de oveja desfibrinado, Oxoïd, ref. n° SR0051C, lote n° 25987000

Solución de inactivación:

- formaldehído, Sigma Aldrich, ref. F-1635, lote n° BCBB3510

APÉNDICE 2

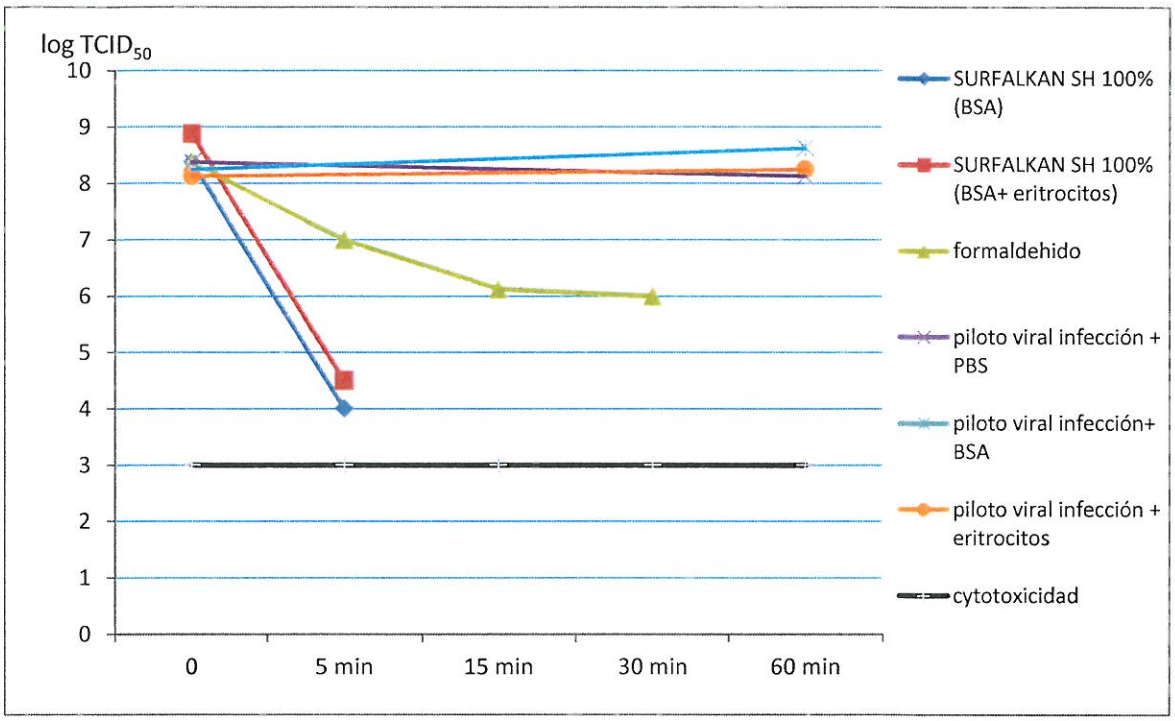
Tabla A1 - Titulación del virus por efecto citopático con el método de cálculo de Spaerman-Kärber:

log $DICT_{50}$ = 8,75

Dilución (- log)	Resultado	% resultados positivos
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	44444444	100
-6	44444444	100
-7	43444444	100
-8	44440242	87,5
-9	33000002	37,5
-10	00000000	0
Suma de los % de culturas positivas		625

Figura 1 – representaciones gráficos de los resultados de las pruebas :

Prueba 1



Prueba 2

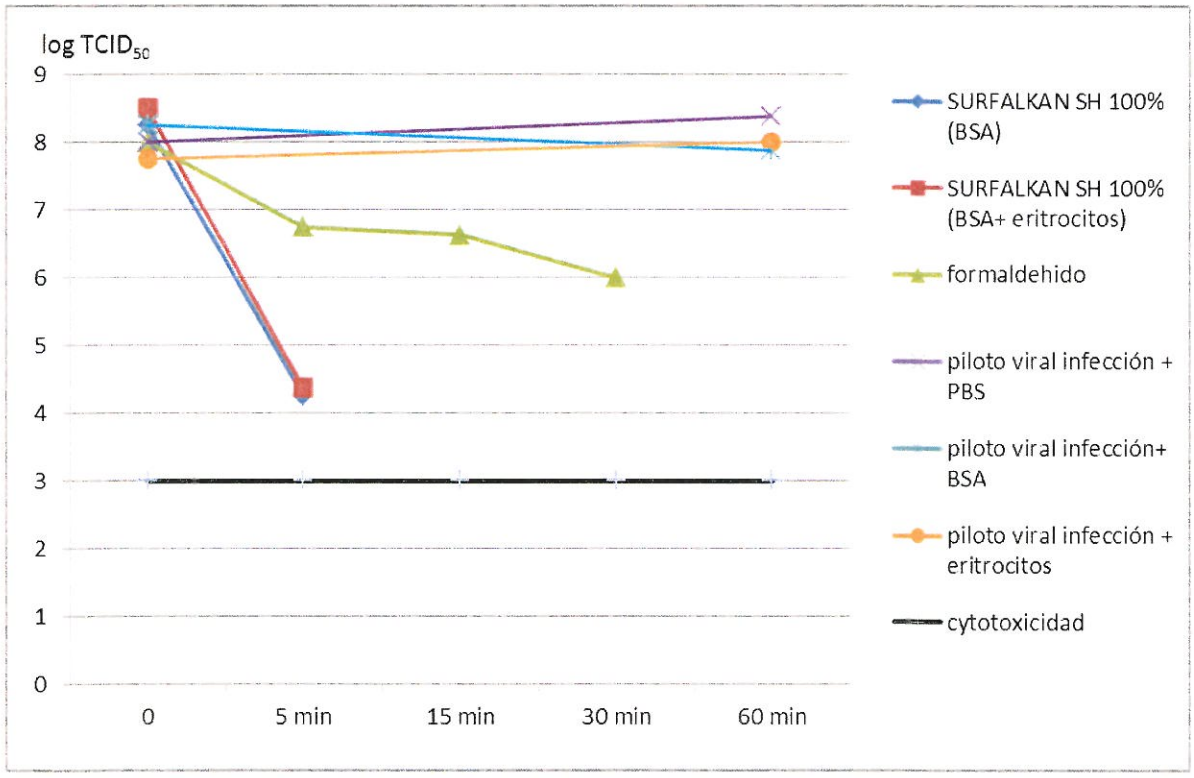


Tabla A2 — Tabla de resultados del producto SURFALKAN SH y del norovirus murino en condiciones de suciedad (3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos)

Producto	Concentración	Sustancia interferente	Nivel de cytotoxicidad	Lg $DICT_{50}$					Reducción
				0	5 min	15 min	30 min	60 min	
SURFALKAN SH prueba 1	100,00%	con 3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	3	8,875	4,5	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R = 4,375
	100,00%	con 3 g/l BSA	3	8,375	4	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R = 4,375
SURFALKAN SH prueba 2	100,00%	con 3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	3	8,5	4,375	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R = 4,125
		con 3 g/l BSA	3	8,25	4,25	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R = 4
Formaldehído prueba 1	1,40%	PBS	1,5	8,375	7	6,125	6	N.T.	
Formaldehído Prueba 2	1,40%	PBS	1,5	8	6,75	6,63	6	N.T.	
Piloto de infección Prueba 1	N.A.	PBS	N.A.	8,375	N.T.	N.T.	N.T.	8,125	
Piloto de infección Prueba 1	N.A.	con 3 g/l BSA	N.A	8,25	N.T.	N.T.	N.T.	8,625	
Piloto de infección Prueba 1	N.A.	con 3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	N.A	8,125	N.T.	N.T.	N.T.	8,25	
Piloto de infección Prueba 2	N.A.	PBS	N.A	8	N.T.	N.T.	N.T.	8,375	
Piloto de infección Prueba 2	N.A.	con 3 g/l BSA	N.A	8,25	N.T.	N.T.	N.T.	7,875	
Piloto de infección Prueba 2	N.A.	con 3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	N.A	7,75	N.T.	N.T.	N.T.	8	
Sensibilidad de las células al virus	SURFALKAN SH	N.A.	células no tratadas	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	8,875	
	10^{-4}	N.A.	células tratadas	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	8	

N.A : No Aplicable N.T. : No probado

Tabla A3 — Datos brutos para el producto SURFALKAN SH con 3 g/l BSA + 3 ml/l eritrocitos de oveja sometidos a prueba contra le norovirus murino (titulación por efecto citopático; 8 pozos)

Prueba 1

Producto	Concentración	Sustancia interferente	Tiempo de contacto	Diluciones									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	5 min	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Piloto viral	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4400	0032	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0334	2221	0000
		3 g/l BSA	5 min	4444	4444	4444	0100	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	1140	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Piloto viral	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4443	3333	0110	0000
				4444	4444	4444	4404	4444	3333	3330	1001	0000	0000
SURFALKAN SH cytotoxicidad	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	N.A.	4444	4444	4004	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
Formaldehído	1,40%	PBS	5	4444	4444	4444	4444	2233	1211	1100	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	3343	2222	0022	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	0444	4300	0003	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	3333	3330	0000	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	4443	3403	0023	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	3343	3333	3330	0000	0000	0000	
Formaldehído (cytotoxicidad)	1,40%	PBS	N.A.	4444	0000	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	0000	0000	0000						
Piloto viral infección	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3434	4003	0200	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	2440	0001	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4404	4444	4040	1140	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4044	3333	3400	0000	0000
Piloto viral infección	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	2322	1300	0100	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	2222	0111	1111	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3111	4003	0121	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4333	3333	3333	0000	0000
Piloto viral infección	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4044	0100	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4000	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4304	3043	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3233	0000	0000

Prueba 2

Producto	Concentración	Sustancia interferente	Tiempo de contacto	Diluciones									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	5 min	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4430	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Piloto viral	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4440	1100	1100	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4222	1114	1122	0100	0000
		3 g/l BSA	5 min	4444	4444	4444	4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Piloto viral	4444	4444	4444	4444	4433	4202	3220	3230	0012	0000
				4444	4444	4444	4444	3313	3333	2203	0002	0111	0000
SURFALKAN SH cytotoxicidad	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	N.A.	4444	4444	0044	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4004	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
Formaldehído	1,40%	PBS	5	4334	3333	3333	3333	1122	1122	0021	0000	0000	N.T.
				4444	3333	3333	3333	2222	1110	0200	0000	0000	
			15	4434	3333	3333	3222	2212	0111	0000	0000	0000	N.T.
				4344	3333	3333	2232	2222	0011	0000	0000	0000	
			30	3333	3333	3333	3333	1222	1010	0000	0000	0000	N.T.
				3333	3333	3333	3333	3222	1100	0000	0000	0000	
Formaldehído (cytotoxicidad)	1,40%	PBS	N.A.	4444	0000	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	0000	0000	0000						
Piloto viral infección	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3333	4300	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	3444	3040	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4434	3333	3003	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4334	3031	3100	1110	0000
Piloto viral infección	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	3333	2222	0102	0100	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4343	2102	2002	0110	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3202	1002	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3334	3022	3031	0000	0000
Piloto viral	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0440	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4040	4400	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4340	3003	0100	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4400	2222	0000	0000

Validaciones con otras concentraciones probadas :

Producto	Concentración	Sustancia interferente	Tiempo de contacto	Diluciones									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	90,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	5 min	4444	4444	4034	3333	3100	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	3333	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Piloto viral	4444	4444	4444	4444	4444	4423	4023	4004	1000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4322	3222	4003	0000	0000
SURFALKAN SH	50,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	5 min	4444	4444	4444	4444	4444	3333	2333	1020	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	2233	1100	0000	0000
			Piloto viral	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4033	2331	1100	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	3333	2200	0001	0000

Producto	Concentración	Sustancia interferente	Nivel de cytotoxicidad	Lg $DICT_{50}$		Reducción > 4 lg después	
				0	5 min		
SURFALKAN SH	90,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	3	8	4,625	5 min R = 3,375	Inactivo a las concentraciones probadas
SURFALKAN SH	50,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	3	8,5	8	5 min R = 0,5	

Sensibilidad de las células al virus :

Productos	dilución	Sustancia interferente		Diluciones								
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	10^{-4}	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	Células no tratadas	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4033	1040	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	1100	0000
			Células tratadas	4444	4444	4444	4444	4444	3044	4000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3444	4444	0000	0000

INFORME DE ANÁLISIS

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD VIRUCIDA EN CONEXIÓN CON EL ROTAVIRUS BOVINO DEL PRODUCTO SURFALKAN SH

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

Fecha de pedido de la prueba: 23/11/2010

Referencias de los informes de análisis: n°326V39-2010

PRUEBAS DE VIRUCIDA:

Según la metodología de la norma europea NF EN 14476+A1 (enero 2007) – antisépticos y desinfectantes químicos – pruebas virucidas cuantitativos de suspensión para los desinfectantes y antisépticos utilizados en la medicina humana.

Pruebas sobre el rotavirus bovino de una muestra de producto desinfectante listo para el empleo, el SURFALKAN SH.

Este informe contiene 13 paginas et solo incluye las muestras utilizadas.

Fecha de expediente: 28/01/2011

Stephanie MOROT-BIZOT
Doctor en microbiología
Encargada del Informe

Professor Georges HERBEIN
Professor en Universidades de Médicos en Hospitales
Experto científico

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 €

ÍNDICE

1. LABORATORIO DIRIGIENDO LAS PRUEBAS
2. IDENTIFICACIÓN COMPLETA DE LAS MUESTRAS
3. CONDICIONES EXPERIMENTALES
4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO
5. PRUEBAS ACTUALES – CALCULO DE LA ACTIVIDAD VIRUCIDA
6. VERIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA
7. CONCLUSIONES
8. APÉNDICES TÉCNICOS

1 LABORATORIO DIRIGIENDO LAS PRUEBAS

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 Besançon

2 IDENTIFICACIÓN COMPLETA DE LAS MUESTRAS

Productos SURFALKAN SH

Numero de lote: 831.11.10
Fecha de caducidad: no especificado
Fabricante: no especificado
Fecha de fabricación: no especificado
Condiciones de almacenaje: según condiciones indicadas por el fabricante
Componentes activos: no especificado
Aspecto: límpido, incoloro.
Diluyente preconizado por el fabricante: ninguno (listo para uso)
Fecha de recepción en el laboratorio: 01/12/2010
Periodo de la prueba: del 13/12/2010 al 21/01/2011

3 CONDICIONES EXPERIMENTALES

Fecha de pruebas: del 13/12/2010 al 21/01/2011

Temperatura de las pruebas: 20°C ± 1°C
Método de titulación: virus titulado en log DICT $_{50}$
Tiempo de contacto: 5 minutos
Diluyente del producto utilizado en las pruebas: agua destilada estéril
Cepa de virus probado: rotavirus bovino ATCC VR-1290, cepa B223, cultivado en células VERO, a 37°C, a menos de 5% CO2
Substancias interferentes: 3 g/l de suero albumino bovino + 3 ml eritrocitos de oveja
Estabilidad del producto en presencia de substancias interferentes: nubloso opaco blanco
Técnica de paro de la acción virucida: con frío

Titulación viral:

Titulación por efecto citopático de la suspensión viral de la prueba del rotavirus bovino (calculado según el método de Spearman-Kärber) = 8,125 log $DICT_{50}$.

4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

a) Metodología

El producto SURFALKAN SH ha sido probado sobre una cultura de células VERO y una ligera citotoxicidad fue observada (hasta dilución 10^{-2}).

b) Sensibilidad de las células a los virus

Para cada una de las suspensiones virales utilizadas para estas pruebas, las titulaciones comparativas de virus fueron hechos en células tratadas o no con el producto.

	Titulación del virus (log $DICT_{50}$)		
Dilución del producto	Suspensión viral en células no tratadas	Dilución del producto	Suspensión viral en células no tratadas
SURFALKAN SH 10^{-3}	7,875	7	**0,875**

La diferencia de la titulación viral debe ser inferior a 1,0 log. El producto SURFALKAN SH probado en la concentración indicada no muestra influencias sobre el método de titulación del rotavirus bovino.

c) Validación de la eficacia del termino de actividad del producto SURFALKAN SH :

Concentración del producto	**Substancias interferentes**	**Titulación de virus (log $DICT_{50}$)**	**Diferencia con la suspensión viral de la prueba**
SURFALKAN SH 100 %	3 g/l BSA	Prueba 1 : 8	0,125
		Prueba 2 : 8,25	-0,125
	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos de oveja	Prueba 1 : 8,25	-0,125
		Prueba 2 : 8,125	0

El método esta validado si la diferencia de la titulación viral es ≤ 0,5 log.

d) Prueba de inactivación de referencia

	Titulación del virus (log $DICT_{50}$)	**Reducción de la titulación viral (log $DICT_{50}$)**
Suspensión viral piloto	8,125	
En formaldehído 1,4%		
Prueba de inactivación 5 min	6,375	1,75
Prueba de inactivación 15 min	6,25	1,875
Prueba de inactivación 30 min	5,75	**2,375**

La validación de las pruebas esta efectiva si la reducción de la titulación viral entre la suspensión piloto y la suspensión sometida al formaldehído se compone entre -0,5 y -2,5 log después de 30 min. La reducción es de 2,375 log después de 30 min y las condiciones de la norma están rellenadas.

5 PRUEBAS ACTUALES – CALCULO DE LA ACTIVIDAD VIRUCIDA

Titulación de la suspensión viral utilizada para el cálculo de la actividad virucida.

Prueba 1

La suspensión viral de la prueba a una concentración de 8,25 log $DICT_{50}$ antes de pruebas para el producto SURFALKAN SH a 100 %, de 7,875 log $DICT_{50}$ para el producto ensayado a 90 % y de 8,25 log $DICT_{50}$ para el producto a 50 %.

PRODUCTO	Concentración (v/v)	Tiempo de contacto	Temperatura de contacto	Titulación después de prueba (log $DICT_{50}$)	Reducción de la titulación viral
SURFALKAN SH	100 %	5 min	20°C	4,125	**4,125**
	90%	5 min	20°C	4,75	**3,125**
	50 %	5 min	20°C	7,875	**0,375**

Prueba 2

La suspensión viral de la prueba con una concentración de 8,125 log $DICT_{50}$ antes de pruebas para el producto SURFALKAN SH à 100 %.

PRODUCTO	Concentración (v/v)	Tiempo de contacto	Temperatura de contacto	Titulación después de pruebas (log $DICT_{50}$)	Reducción de la titulación viral
SURFALKAN SH	100 %	5 min	20°C	3,875	**4,25**

Las concentraciones probadas del producto son virucidas si la reducción de la titulación viral es superior o igual a 4,0 log.

6 VERIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA

Las pruebas realizadas satisfacen a los criterios de validación por las siguientes razones:

- La titulación de la suspension viral de prueba esta suficientemente importante para permitir una observación de reducción de 4 log después de pruebas; es de 8,125 log $DICT_{50}$ para le rotavirus bovino.

- La diferencia des las titulaciones entre piloto viral y virus de referencia en la prueba de inactivación esta entre -0.5 y - 2.5 después de 30 minutos; la diferencia es de 2,375 log después de 30 min de inactivación por el formaldehído para el rotavirus bovino.

- El producto probado no afecta sensiblemente la morfología de las células.

- Les condiciones de pruebas (sucios) (eritrocitos de oveja + BSA) no afectan la infección potencial del virus.

- El producto probado no reduce la sensibilidad de las células al rotavirus bovino. Las titulaciones de virus puestos en contacto con las células tratadas con el producto y las células no tratadas tienen una diferencia inferior a 1,0 log (la diferencia es de 0,875 log).

- La diferencia de titulación entre la prueba de suspension viral y el control de eficacia del paro de actividad del desinfectante es inferior a 0,5 log (-0,125 log $DICT_{50}$ prueba 1, et 0 log $DICT_{50}$ prueba 2)

7 CONCLUSIONES

Las pruebas realizadas en el producto SURFALKAN SH han demostrado:

- que el producto **SURFALKAN SH** **utilizado puro para una actividad virucida en el rotavirus bovino,** según la metodología de la norma NF EN 14476+A1, **para 5 minutos de contacto a 20°C, en condiciones de suciedad, tiene una actividad virucida.**

APÉNDICE 1

Linaje celular utilizado: células VERO (R&D BIOTECH, lote n°110118-110V)

Cepa viral: rotavirus bovino cepa B223, ATCC VR-1290 (lote n° 4/200409/220409)

Tapones y centros de cultura:

- Tapón PBS: cloruro de sodio, Panreac, ref. 141659.1211, lote n° 0000204679; fosfato de sodio dibásico, Sigma Aldrich, ref. S5136, lote n° BCBC7067V; fosfato de sodio monobásico, Sigma Aldrich, ref. S5011, lote n° 1019K01021V
- Medio MEM, Sigma Aldrich, ref. M0268, lote n° 040M8301
- Medio DMEM, Sigma Aldrich, ref. D6546, lote n° RNBB3646
- Suero fetal de ternero, Milerium, cat. BWSTS1810/500, lote n° VWR-3826

Reactivos:

- Suero de albúmina bovino en polvo, Sigma Aldrich, ref. A7906, lote n° 078K0729
- Sangre de oveja desfibrinado, Oxoïd, ref. n° SR0051C, lote n° 25987000

Solución de inactivación:

- formaldehído, Sigma Aldrich, ref. F-1635, lote n° BCBB3510

APÉNDICE 2

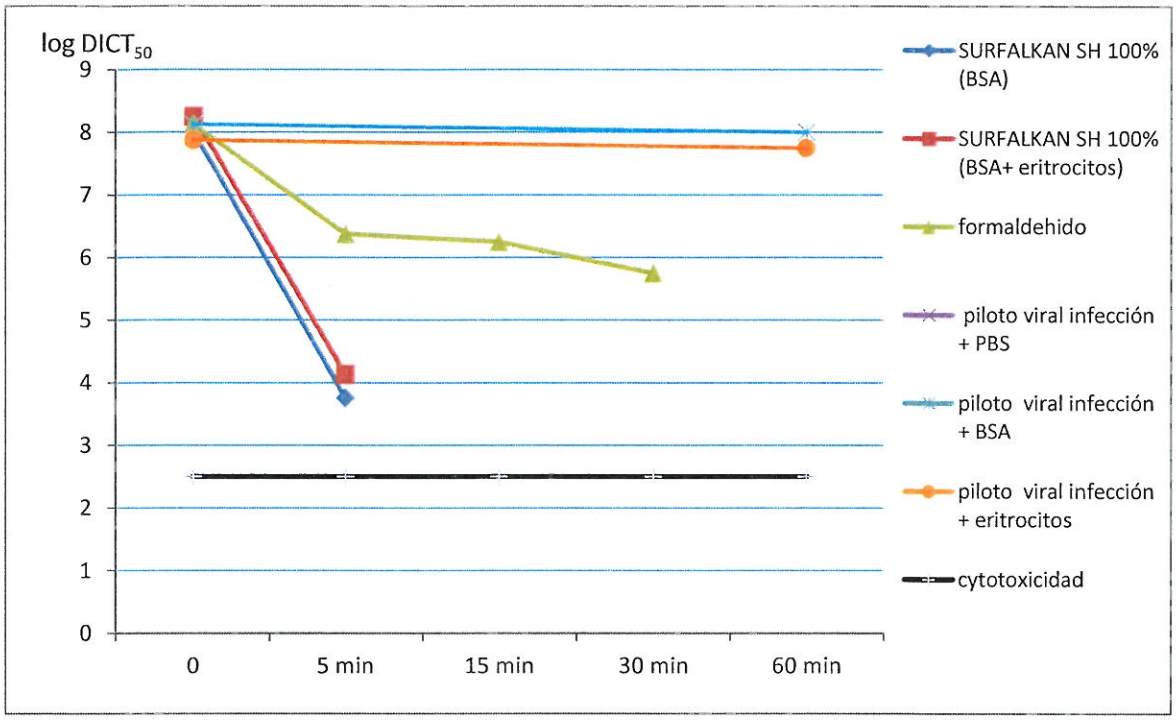
Tabla A1 - Titulación del virus por efecto citopático con el método de cálculo de Spaerman-Kärber:

log $DICT_{50}$ = 8,125

Dilución (- log)	Resultado	% resultados positivos
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	44444444	100
-6	44444444	100
-7	23222232	100
-8	22020220	62,5
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Suma de los % de culturas positivas		562,5

Figura 1 – representaciones gráficos de los resultados de las pruebas :

Prueba 1



Prueba 2

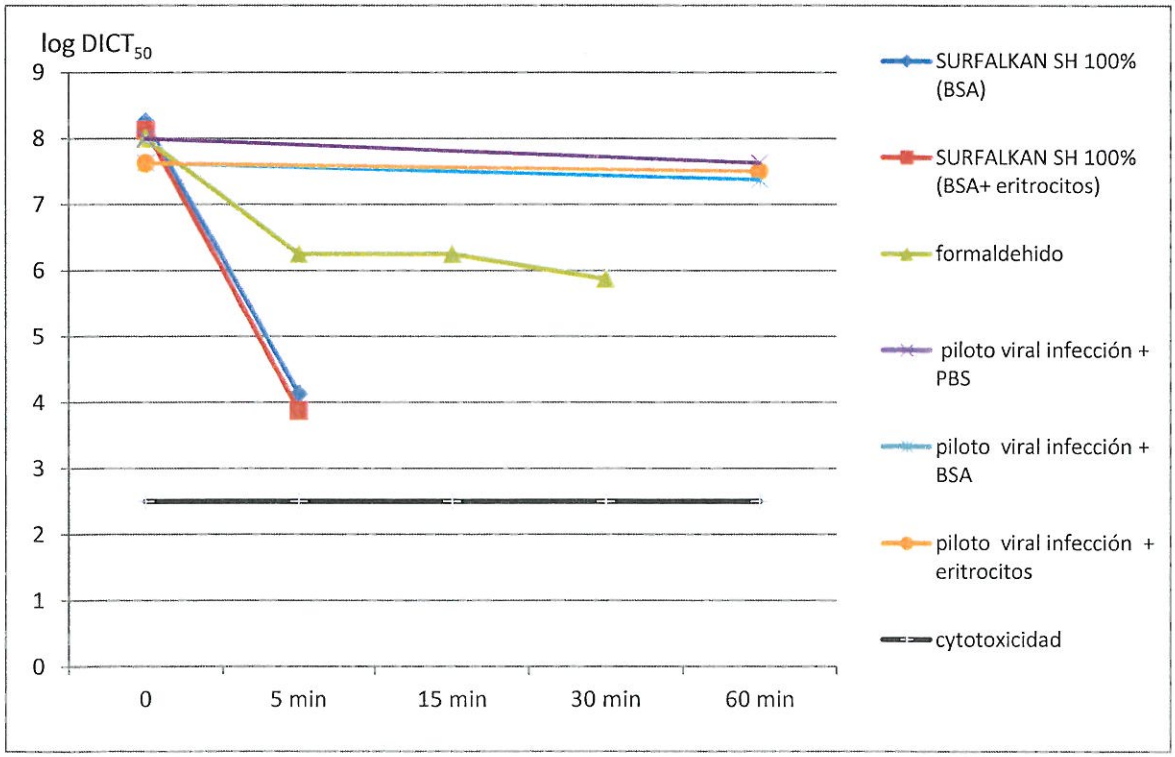


Tabla A2 — Tabla de resultados del producto SURFALKAN SH y del rotavirus bovino en condiciones de suciedad (3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos)

Producto	Concentración	Sustancia interferente	Nivel de cytotoxicidad	Lg $DICT_{50}$					Reducción
				0	5 min	15 min	30 min	60 min	
SURFALKAN SH prueba 1	100,00%	con 3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	2,5	8,25	4,125	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R = 4,125
	100,00%	con 3 g/l BSA	2,5	8	3,75	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R = 4,25
SURFALKAN SH prueba 2	100,00%	con 3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	2,5	8,125	3,875	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R = 4,25
		con 3 g/l BSA	2,5	8,25	4,125	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R = 4,125
Formaldehído prueba 1	1,40%	PBS	1,5	8,125	6,375	6,25	5,75	N.T.	
Formaldehído Prueba 2	1,40%	PBS	1,5	8	6,25	6,25	5,875	N.T.	
Piloto de infección Prueba 1	N.A.	PBS	N.A.	8,125	N.T.	N.T.	N.T.	8	
Piloto de infección Prueba 1	N.A.	con 3 g/l BSA	N.A	8,125	N.T.	N.T.	N.T.	8	
Piloto de infección Prueba 1	N.A.	con 3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	N.A	7,875	N.T.	N.T.	N.T.	7,75	
Piloto de infección Prueba 2	N.A.	PBS	N.A	8	N.T.	N.T.	N.T.	7,625	
Piloto de infección Prueba 2	N.A.	con 3 g/l BSA	N.A	7,625	N.T.	N.T.	N.T.	7,375	
Piloto de infección Prueba 2	N.A.	con 3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	N.A	7,625	N.T.	N.T.	N.T.	7,5	
Sensibilidad de las células al virus	SURFALKAN SH	N.A.	células no tratadas	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7,875	
	10^{-3}	N.A.	células tratadas	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7	

N.A : No Aplicable N.T. : No probado

Tabla A3 — Datos brutos para el producto SURFALKAN SH con 3 g/l BSA + 3 ml/l eritrocitos de oveja sometidos a prueba contra le rotavirus bovino (titulación por efecto citopático; 8 pozos)

Prueba 1

	Concentración	Sustancia interferente	Tiempo de contacto	Diluciones									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	5 min	4444	4444	4444	0033	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	1130	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Piloto viral	4444	4444	4444	4444	4444	4444	2223	0011	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	2333	1111	0000	0000
		3 g/l BSA	5 min	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	1100	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Piloto viral	4444	4444	4444	4444	4444	4444	1144	3100	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	1141	1001	0000	0000
SURFALKAN SH cytotoxicidad	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	N.A.	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
Formaldehído	1,40%	PBS	5	4444	4444	4444	4444	2222	1001	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	2222	1111	1000	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	3333	1211	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	3333	2002	0000	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	3333	0211	0100	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	3333	1111	0110	0000	0000	0000	
Formaldehído (cytotoxicidad)	1,40%	PBS	N.A.	4444	0000	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	0000	0000	0000						
Piloto viral infección	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3333	0004	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	2222	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	2303	0033	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3444	3333	3033	0000	0000
Piloto viral infección	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4044	3030	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3333	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4022	0222	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	2024	2210	0000	0000
Piloto viral infección	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	2002	3022	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	2222	3020	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	2022	0022	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4022	2002	0000	0000

Prueba 2

Producto	Concentración	Sustancia interferente	Tiempo de contacto	Diluciones									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	5 min	4444	4444	4444	0340	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	0400	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Piloto viral	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4333	0022	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0333	1112	0000	0000
		3 g/l BSA	5 min	4444	4444	4444	4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	0444	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Piloto viral	4444	4444	4444	4444	4444	3044	4443	0322	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4433	3333	2222	0000	0000
SURFALKAN SH cytotoxicidad	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	N.A.	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
Formaldehído	1,40%	PBS	5	4444	4444	4444	4444	3444	3033	0030	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	3333	0033	0000	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	3333	2210	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	4222	1101	0000	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	4444	1222	0100	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	2112	0101	0000	0000	0000	
Formaldehído (cytotoxicidad)	1,40%	PBS	N.A.	4444	0000	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	0000	0000	0000						
Piloto viral infección	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	3443	3032	0222	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	2222	2200	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3403	0300	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	3344	0300	0000	0000
Piloto viral infección	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	3333	3033	0200	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	3230	2002	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	2322	2200	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	2333	2220	1020	0000	0000
Piloto viral	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	0	4444	4444	4444	4444	4444	2221	1101	0001	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	2222	1011	1010	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1112	1010	0011	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	1111	0000	0000	0000

Validaciones con otras concentraciones probadas :

Producto	Concentración	Sustancia interferente	Tiempo de contacto	Diluciones									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	90,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	5 min	4444	4444	4444	3222	0101	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	2222	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Piloto viral	4444	4444	4444	4444	4444	3233	3022	0211	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	0222	1100	0000	0000
SURFALKAN SH	50,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	5 min	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3333	0011	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	3333	0100	0000	0000
			Piloto viral	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3333	0122	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	3333	1110	0000	0000

Producto	Concentración	Sustancia interferente	Nivel de cytotoxicidad	Lg $DICT_{50}$		Reducción > 4 lg después	
				0	5 min		
SURFALKAN SH	90,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	2,5	7,875	4,75	5 min R = 3,125	Inactivo a las concentraciones probadas
SURFALKAN SH	50,00%	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	2,5	8,25	7,875	5 min R = 0,375	

Sensibilidad de las células al virus :

Productos	dilución	Sustancia interferente		Diluciones								
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	10^{-3}	3 g/l BSA + 3 ml eritrocitos	Células no tratadas	4444	4444	4444	4444	4444	4444	1100	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	1000	0000	0000
			Células tratadas	4444	4444	4444	4 444	4444	3300	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4 444	4444	0303	0000	0000	0000

MIKROLAB GMBH
Laboratory for applied microbiology

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

TEST REPORT

11.07.2011

Test report no. S11ML1235-2P

Evaluation of the effectiveness of

SURFALKAN SH

Test virus: Pseudorabies virus (PRV) (surrogate of HBV)

Method: following NF T72-185; NF EN 14476+A1:2007-01-01 under dirty 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 surface disinfectant SURFALKAN SH against Pseudorabies Virus (PRV) (surrogate of HBV) using a quantitative suspension assay following EN 14476:2007-02 (1) under dirty conditions.

2. Test laboratory

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

3. Identification of the test sample

Manufacturer	ALKAPHARM
Name of product	SURFALKAN SH
Application	surface disinfectant
Batch number	2011.02.01.61
Expiry date	02/2014
Active compound (s)	alkylbenzyldimethylammonium chloride ethanol
Appearance and odour	clear, colourless liquid; product specific
pH-value (s) in WSH	undiluted: 5.78 (20°C)
Storage conditions	room temperature in the dark (area with restricted access)
Date of arrival in the laboratory	02.05.2011

4. Materials

4.1 Culture medium and reagents

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

4.2 Virus and cells

Pseudorabies virus strain Aujeszki Bartha K61 was obtained from Dr. Barbara Klupp, Friedrich-Loeffler-Institute, Federal Research Institute for Animal Health, D-17493 Greifswald - Isle of Riems.

Vero cells originated from Vircell, S.L., 18320 Santa Fe, Spain (now BIOTRIN International GmbH, 69126 D-Heidelberg).

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

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)
- MicroSpin™ S-400 HR columns (GE Healthcare, Freiburg, Germany).

5. Experimental conditions

Test temperature	20°C ± 1.0°C
Concentration of test product	undiluted (80.0 %) and 10.0 % (non-active range)
Contact times	1, 5, 10 and 60 minutes
Interfering substances	dirty conditions: 3.0 g/l bovine serum albumin (BSA) + 3.0 g/l erythrocytes
Diluent	water of standardised hardness (10.0 % solution)
Stability of product in the mix with virus and interfering substance (80.0 %)	no flocculation
Procedure to stop action of product	immediate dilution, gel filtration and assay following method of Lycke
Test virus strain	Pseudorabies Virus (PRV) strain Aujeszki Bartha K61
Test period	02.05.2011 – 11.07.2011
End of testing	11.07.2011

6. Methods

6.1 Preparation of test virus suspension

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

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

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

6.3 Infectivity assay

Infectivity was determined 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 *Vero 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 surface disinfectant SURFALKAN SH was examined undiluted (80.0 %) and as 10.0 % solution in hard water according to EN 5.2.2.2.
1, 5, 10 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 (dirty 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).

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 were used in order to remove the cytotoxic agents according to the instructions of the manufacturer. Virus controls with and without MicroSpin™ S-400 HR columns were included.

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 Inactivation assay following the method of Lycke[1]

Following a modified procedure as described by Lycke (4), the test mixture was added to a columns (as described in 6.5), and the eluate was further diluted 1:2,000 in EMEM and then the total volume was added (without any further dilution) to the permissive cells. By introducing such a huge dilution it is possible to eliminate cytotoxicity of the test product in order to demonstrate a 4 log_{10}-reduction of virus titre. This method is necessary for those products which demonstrate a great cytotoxicity.

100 µl of the test virus suspension and 100 µl interfering substance were mixed with 800 µl disinfectant at 20°C. At the end of the exposure time (1 min) 31.25 µl of the mixture were immediately added to 62.5 ml EMEM (1:2,000 dilution) and then the volume was distributed in six microtitre plates (108 µl / well). After 10 days of inoculation cultures were observed for cytopathic effects. The calculation of virus titre followed the formula of Lycke:

$$-\log_{10} = [1.4 \times \ln (1-p)].$$

p is meaning the relation between the positive wells with virus detection in comparison to the total number of wells.

For the control of cell sensitivity 200 µl Aqua bidest. were mixed with 800 µl disinfectant (PBS as control). Then, an aliquot was added to the columns, the eluate was diluted 1:2,000 and 108 µl of this dilution were added to the 48 wells of a microtitre plate with a preformed monolayer of *Vero cells*. After at least one hour, a comparative virus titration was performed on the cells treated in such a manner or treated with PBS only.

[1] Method not accredited

Determination of the initial virus titre was performed in a quantitative suspension test by a fivefold assay. The virus-inactivating properties of the test product were calculated by subtracting the virus titre in the test mixture from the virus control.

6.7 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).

6.8 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}.

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 (80.0 % solutions) after introduction of the columns and with the assay following the method of Lycke.

b) The cytotoxicity of the undiluted test product was three log_{10}-steps.

c) The comparative titration on pretreated (disinfectant) and non pretreated (PBS) *Vero cells* showed an acceptable difference (<1 log_{10}; EN 6.6.4.2) of virus titres: 7.25 (PBS) versus 6.88 log_{10} $TCID_{50}$/ml (undiluted test product).

d) The control of efficacy for suppression of disinfectant activity demonstrated a reduction of virus titre due to the fact that even the 10.0 % solution was active against PRV.

Since all criteria following EN 8.3 were fulfilled, examinations with PRV following EN 14476 are valid.

8. Results

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

The undiluted test product was able to inactivate PRV after one minute exposure time in this quantitative suspension test. At that time point, no PRV was detectable. The reduction factor was ≥ 2.50.

Due to the cytotoxicity no reduction of 4 log_{10} steps could be demonstrated. Therefore, the method of Lycke in combination with columns was introduced. The results are given in table 7.

The virus titre in the fivefold assay was log_{10} $TCID_{50}$ / ml = 6.75. This value corresponded to the virus amount in the assays of 5.25 log_{10} $TCID_{50}$.

Since in 576 cell culture units no residual virus could be detected the result according to the formula of Lycke is log_{10} = 0. The reduction factor is therefore log_{10} 5.25 minus log_{10} 0 = 5.25 after one minute of exposure time.

The 10.0 % solution was additionally active (no residual virus) against the PRV after one minute of exposure time (RF ≥ 3.50).

9. Summary

In summary, a sufficient reduction of virus titre could be achieved by the disinfectant SURFALKAN SH undiluted 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 surface disinfectant SURFALKAN SH for inactivation of Peudorabies virus (surrogate of HBV) as follows:

dirty conditions	**undiluted**	**one minute**

Bremen, 11.07.2011

- 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

4. Lycke, E.: Studies of the Inactivation of Poliomyelitis Virus by Formaldehyde.
   Arch Ges Virusforsch; 7, 1957: 483-493

Appendix

Table 1: Raw data of SURFALKAN SH (80.0 %) tested against PRV without columns (dirty conditions)

Table 2: Raw data of SURFALKAN SH (10.0 %) tested against PRV without columns (dirty conditions)

Table 3: Raw data of formaldehyde (0.7 %) tested against PRV

Table 4: Control of efficacy for suppression of disinfectant activity (80.0 %)

Table 5: Raw data (PRV) for cell sensitivity (80.0 %) with columns

Table 6: Determination of virus titre (assay following method of Lycke)

Table 7: Inactivation of PRV by SURFALKAN SH (80.0%) in the assay following the method of Lycke (1 minute exposure time)

Table 8a: Summary of results (quantitative suspension test) with SURFALKAN SH and PRV

Table 8b: Summary of results (assay following Lycke) with SURFALKAN SH and PRV

Table 1: Raw data of SURFALKAN SH (80.0 %) tested against PRV without columns (quantal test; 8 wells) (2625)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	80.0%	dirty	1	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			5	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			10	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
test product cytotoxicity	80.0%	dirty	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	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.	dirty	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4304 4040	0000 0003	0000 0000	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	3240 0400	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 of SURFALKAN SH (10.0 %) tested against PRV without columns (quantal test; 8 wells) (2625)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	10.0%	dirty	1	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			5	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			10	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.
test product cytotoxicity	10.0%	dirty	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	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.	dirty	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4304 4040	0000 0003	0000 0000	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	3240 0400	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 formaldehyde (0.7 %) tested against PRV (quantal test; 8 wells) (2625)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
test product	n.a.	dirty	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.
test product cytotoxicity	n.a.	dirty	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	0002 4444	0000 0020	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	4444 3434	0120 0002	0000 2000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	2022 2233	0000 2000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	0001 0000	1000 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.	PBS	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0044 0400	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: Control of efficacy for suppression of disinfectant activity (80.0 %) (2625)

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	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product	dirty	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.

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

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

Table 5: Raw data (PRV) for cell sensitivity with columns (80.0 %) (2625)

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	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PBS	dirty	-	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0444 4400	4000 0000	0000 0000	n.d.
test product	PBS	1:2,000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product	clean	1:2,000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
test product	dirty	1:2,000	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0444 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 6: Determination of virus titre with columns (assay following method of Lycke) (2625)

Virus titration	Interfering substance	dilutions (log_{10})								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1st assay	dirty conditions	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 3444	3000 0004	0000 0000	0000 0000	n.d.
2nd assay	dirty conditions	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4003 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
3rd assay	dirty conditions	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4443	4000 4000	0000 0004	0000 0000	n.d.
4th assay	dirty conditions	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0002	0000 0000	0000 0000	n.d.
5th assay	dirty conditions	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0440	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 7: Inactivation of PRV by SURFALKAN SH (80.0 %) in the assay following the method of Lycke with columns (1 minute exposure time) (2625)

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

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

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

Table 8a: Summary of results (quantitative suspension test) with SURFALKAN SH and PRV

Product	Con-centration	Interfering substance	Level of cytotoxicity	log_{10} $TCID_{50}$/ml after ....min								> 4 log_{10} reduction after ... min
				0	0.5	1.0	5.0	10.0	15.0	30.0	60.0	
product	80.0%	dirty conditions	4.50	n.d.	n.d.	≤ 4.50	≤ 4.50	≤ 4.50	n.d.	n.d.	≤ 4.50	≥ 1
product	10.0%	dirty conditions	3.50	n.d.	n.d.	≤ 3.50	≤ 3.50	≤ 3.50	n.d.	n.d.	≤ 3.50	≥ 1
form-aldehyde	0.7% (m/V)	PBS	3.50	n.d.	n.d.	n.d.	6.25	n.d.	5.00	≤ 4.50	≤ 3.75	> 60 min
virus control	n.a.	dirty conditions	n.a.	7.25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.00	n.a.
virus control	n.a.	PBS	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.88	n.a.
suppression control	80.0%	dirty	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	≤ 4.50	n.d.	n.a.
sens. control with PBS (col)	n.a.	n.a.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.
sens. control product (col)	1:100	n.a.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.

n.a. = not applicable n.d. = not done col = columns Sens. = sensitivity

Table 8b: Summary of results (assay following Lycke) with SURFALKAN SH and PRV

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	
product (col)	80.0%	dirty conditions	4.50	n.d.	n.d.	n.d.	0.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.0
virus control (col)	n.a.	dirty conditions	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.75/ 6.75/ 6.88/ 6.63/ 6.75	n.a.
sens. control with PBS (col)	n.a.	dirty conditions	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.25	n.a.
sens. control product (col)	n.a.	dirty conditions	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.75	n.a.

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

TEST REPORT

VIRUCIDAL QUANTITATIVE SUSPENSION TEST USING BVD VIRUS ON SURFALKAN SH PRODUCT

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

Study number: n°088V52-2011

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 medicine.

Tests using the SURFALKAN SH product against the BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus).

This test report included 13 pages.

Study completion date: 05-20-2011

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

1. PERFORMING LABORATORY

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 Besançon

2. PRODUCT IDENTITY

SURFALKAN SH

Batch number: 2011.02.01.61
Expiration date: 2014.02
Manufacturer: ALKAPHARM
Storage conditions: room temperature
Active substances: 0 %< fatty alcohol ethoxylate < 2,5 %
Appearance: clear.
Product diluent recommended by the manufacturer: none (ready-to-use)
Date of delivery of the product: 04-07-2011
Date of tests: from 04-09-2011 to 05-13-2011

3. EXPERIMENTAL CONDITIONS

Temperature used during the assays: 20°C ± 1°C
Titration units: log TCID50
Exposure Time: 5 minutes
Diluent used for the product: sterile distilled water
Viral strain: BVDV, grown on BT cells, at 37°C, under 5% CO2 atmosphere
Organic soil load: 3 g/l bovine albumin sera + 3 ml/l sheep erythrocytes
Product stability: white turbid solution with organic soil load
Stop solution: cold shock

Date of tests: from 04-13-2011 to 05-13-2011

Viral titer:

Viral titers are expressed in log $TCID_{50}$ per ml, according to the SPEARMAN-KÄRBER method. Titer of BVD virus suspension assay = 8,375 log $TCID_{50}$.

4. VALIDATIONS

a) Methodology

The BT cells were exposed to the SURFALKAN SH product 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 SURFALKAN SH product (indicator cell line), and titrated on cell cultures treated with the SURFALKAN SH product.

	Viral titer (log $TCID_{50}$)		
Product dilution	Untreated cell cultures	Treated cell cultures	**Difference of viral titer**
SURFALKAN SH 10^{-3}	8,5	8,125	**0,375**

According to the European standard EN 14476 + A1, the SURFALKAN SH 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 on the virucidal effect of the SURFALKAN SH product

Product Concentration	**Organic soil load**	**Viral titer (log $TCID_{50}$)**	**Difference with the viral suspension assay**
SURFALKAN SH 100 %	3 g/l BSA	Trial 1 : 8,25	0,125
		Trial 2 : 8	0,375
	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	Trial 1 : 8	0,375
		Trial 2 : 8,125	0,25

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

c) 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	8,25	
With 1,4%formaldehyde		
Inactivation exposure 5 min	7,625	0,625
Inactivation exposure 15 min	6,75	1,5
Inactivation exposure 30 min	6,375	**1,875**

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 1,875 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 **8,25 log $TCID_{50}$** prior the assays on SURFALKAN SH product at 100 %, with organic soil load (3 g/l of BSA), and at **8 log $TCID_{50}$** prior the assays for 100% of SURFALKAN SH with organic soil load (3 g/l BSA + 3 ml of sheep erythrocytes).

PRODUCT	Organic soil load	Concentration (v/v)	Time exposure	Temperature	Viral titer (log $TCID_{50}$)	Viral titer reduction
SURFALKAN SH	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	100 %	5 min	20°C	3	**5**
	3 g/l BSA	100 %	5 min	20°C	3,125	**5,125**

Trial 2

The viral test suspension was titrated at **8 log TCID50** prior the assays on SURFALKAN SH product at 100 %, with organic soil load (3 g/l of BSA), and at **8,125 log TCID50** prior the assays for 100% of SURFALKAN SH with organic soil load (3 g/l BSA + 3 ml of sheep erythrocytes).

PRODUCT	Organic soil load	Concentration (v/v)	Time exposure	Temperature	Viral titer (log $TCID_{50}$)	Viral titer reduction
SURFALKAN SH	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	100 %	5 min	20°C	3,25	**4,875**
	3 g/l BSA	100 %	5 min	20°C	3,125	**4,875**

The concentrations of the product demonstrated a virucidal activity on the virus tested if the viral titer reduction is ≥ 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 BVD virus was of 8,375 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 1,875 log for the BVD virus.

- The SURFALKAN SH product does not have a cytotoxic effect on the BT cells.

- The SURFALKAN SH product does not affect the infectious capacity of the virus: the differences in viral titers between the virus inoculated on BT cells and the virus inoculated on the BT cells treated with the SURFALKAN SH was ≤ 1,0 log (0,375 log).

- The difference between the viral suspension assay titer and the viral suspension titer in the cold shock validation was ≤ 0,5 log (0,375 log $TCID_{50}$ trial 1, and 0,25 log $TCID_{50}$ trial 2)

- The trials in dirty conditions (3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes) does not affect the infectious capacity of the virus

The assays performed with SURFALKAN SH product demonstrated that:

- **the SURFALKAN SH product demonstrated a virucidal activity on the Bovine Viral Diarrhea virus from the concentration 100% and 90%,** as required by the European standard EN 14476+A1, following a **5 minutes** exposure period, at 20°C, in dirty conditions.

- **The BVDV virus is used as a surrogate of the Hepatitis C Virus (HCV); as the SURFALKAN SH product demonstrated a virucidal activity on the BVDV in the conditions tested, this product also has a virucidal activity on the HCV, at concentrations 100% and 90%, for a 5 minutes exposure period, at 20°C, in dirty conditions.**

TECHNICAL APPENDIX 1

Cell line: BT cells (ATCC réf. CRL-1390, batch n°58078520)

Viral strain: Bovine Viral Diarrhea Virus (ATCC réf. VR-534, batch n°10W)

Buffer and reagents:

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

Organic soil load:

- Bovine albumin serum (powder), Sigma Aldrich, réf. 05479, batch n° STBB7838V
- Sheep erythrocytes, Oxoïd, réf. SR 0051E, batch n° 30964000

Inactivation solution:

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

TECHNICAL APPENDIX 2

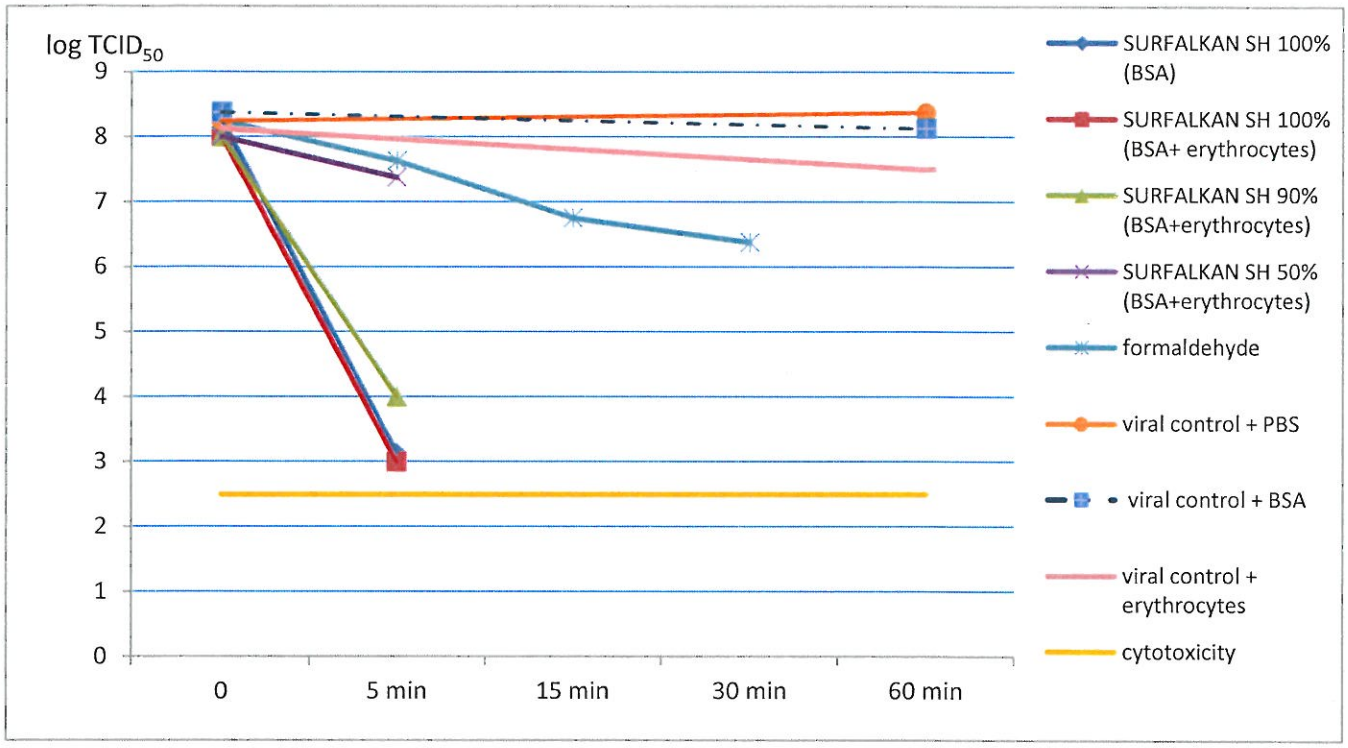
Table A1 - Titration of BVDV by cytopathic effect, with the Spaerman-Kärber method :

log $TCID_{50}$ = 8,375

Dilution (- log)	Results	% positive results
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	44444444	100
-6	44333433	100
-7	22332112	100
-8	11101121	87,5
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Sum of the positives results		587,5

Fig.1- Chart of the results:

Trial 1



Trial 2

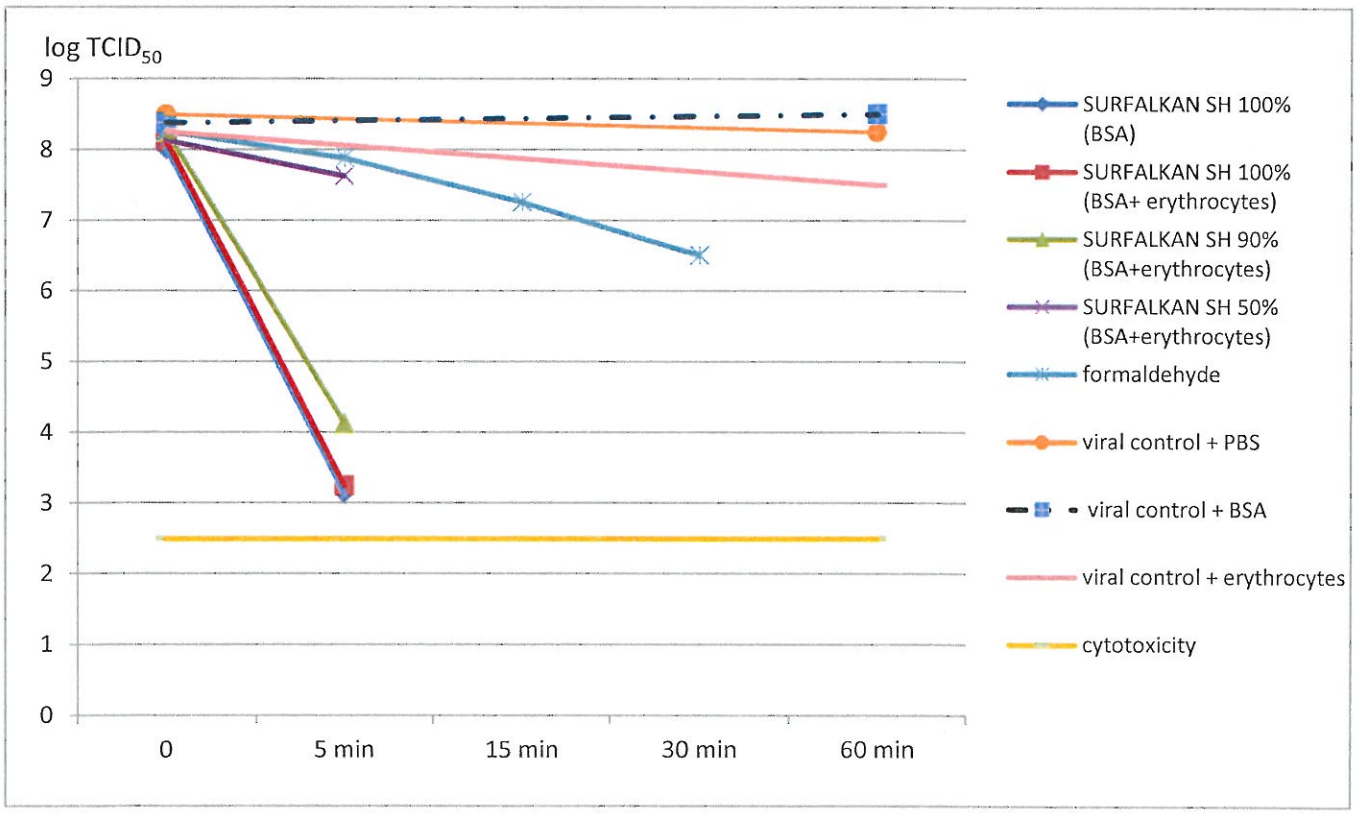


Table A2 — Results for the SURFALKAN SH product and the BVD virus in dirty conditions (3 g/l BSA + 3 ml/l sheep erythrocytes)

Product	Concentration	Organic soil load	Cytotoxicity level	Log $TCID_{50}$					Reduction
				0	5 min	15 min	30 min	60 min	
SURFALKAN SH trial 1	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	2,5	8	3	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R = 5
	100,00%	3 g/l BSA	2,5	8,25	3,125	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R = 5,125
SURFALKAN SH trial 2	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	2,5	8,125	3,25	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R = 4,875
		3 g/l BSA	2,5	8	3,125	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R = 4,875
Formaldehyde Trial 1	1,40%	PBS	2,5	8,25	7,625	6,75	6,375	N.T.	
Formaldehyde Trial 2	1,40%	PBS	2,5	8,25	7,875	7,25	6,5	N.T.	
Infectivity control trial 1	N.A.	PBS	N.A.	8,25	N.T.	N.T.	N.T.	8,375	
Infectivity control trial 1	N.A.	3 g/l BSA	N.A	8,375	N.T.	N.T.	N.T.	8,125	
Infectivity control trial 1	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	N.A	8,125	N.T.	N.T.	N.T.	7,5	
Infectivity control Trial 2	N.A.	PBS	N.A	8,5	N.T.	N.T.	N.T.	8,25	
Infectivity control Trial 2	N.A.	3 g/l BSA	N.A	8,375	N.T.	N.T.	N.T.	8,5	
Infectivity control trial 2	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	N.A	8,25	N.T.	N.T.	N.T.	7,5	
Cells sensitivity to the virus	SURFALKAN SH	N.A.	Cells non treated	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	8,5	
	10^{-3}	N.A.	Cells treated	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	8,125	

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

Table A3 —Raw data for SURFALKAN SH product (3 g/l BSA + 3 ml/l sheep erythrocytes) tested against the BVD virus (titration by cytopathic effect; 8 wells)

Trial 1

	Concentration	Organic soil load	Exposure time	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	5 min	4444	4444	1001	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	1100	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3333	1010	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	2233	1010	0000	0000
	100,00%	3 g/l BSA	5 min	4444	4444	1120	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	1100	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	4444	4444	2222	0011	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4222	1111	0000	0000
SURFALKAN SH cytotoxicity	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A.	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
Formaldehyde	1,40%	PBS	5	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3333	1000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	4444	4433	1111	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	3333	2223	2210	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	3333	2220	0000	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	3333	2222	2211	1000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4433	2222	1100	0000	0000	0000	
Formaldehyde (cytotoxicity)	1,40%	PBS	N.A.	4444	4444	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	4444	0000	0000						
Viral control of infectivity	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	3334	1221	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4443	1111	1100	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	1101	0000	0000
Viral control of infectivity	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	3333	2112	1011	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4433	1111	1100	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	0111	0000	0000
Viral control of infectivity	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	0	4444	4444	4444	4444	4444	3333	2222	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	1112	1000	0000	0000
			60	4444	4444	4444	3333	3333	1221	1110	1100	0000	0000
				4444	4444	4444	3333	3333	1111	1101	0000	0000	0000

Trial 2

	Concentration	Organic soil load	Exposure time	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	5 min	4444	4444	2021	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	1110	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Témoin viral	4444	4444	4444	4444	4444	3232	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	2222	1201	1001	0000	0000
	100,00%	3 g/l BSA	5 min	4444	4444	2201	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	2200	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Témoin viral	4444	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0011	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	2221	0011	0000	0000
SURFALKAN SH cytotoxicity	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A.	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
Formaldehyde	1,40%	PBS	5	4444	4444	4444	4444	4444	3333	3113	1100	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	1000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	3333	2222	1111	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	4443	2222	1100	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	4444	3322	2211	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4444	3322	1111	0000	0000	0000	
Formaldehyde (cytotoxicity)	1,40%	PBS	N.A.	4444	4444	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	4444	0000	0000						
Viral control of infectivity	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	3333	2222	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	2222	1111	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	3333	2222	0011	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	2221	1111	0000	0000
Viral control of infectivity	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	3333	2211	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	2222	1011	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000
Viral control of infectivity	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	0	4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	1100	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	3333	1111	0011	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	1111	1110	1110	0000	0000

Validations with other concentrations:

Produit	Concentration	Organic soil load	Time of exposure	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	90% trial 1	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	5 min	4444	4444	4444	2011	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	1000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3333	1010	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	2233	1010	0000	0000
SURFALKAN SH	90% trial 2	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	5 min	4444	4444	4444	0011	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	1110	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	4444	3232	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	2222	1201	1001	0000	0000
SURFALKAN SH	50% trial 1	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	5 min	4444	4444	4444	4444	4444	2333	1011	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	4444	4444	3333	1010	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	2233	1010	0000	0000
SURFALKAN SH	50% trial 2	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	5 min	4444	4444	4444	4444	2222	2222	1111	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	2222	1112	1111	1000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	4444	3232	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	2222	1201	1001	0000	0000

Product	Concentration	Organic soil load	Cytotoxicity level	Log $TCID_{50}$		Reduction > 4 lg after	
				0	5 min		
SURFALKAN SH	90% trial 1	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	2,5	8	4	5 min R = 4	Active
	90% trial 2	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	2,5	8,125	4,125	5 min R = 4	Active
	50% trial 1	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	2,5	8	7,375	5 min R = 0,625	Inactive
	50% trial 2	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	2,5	8,125	7,625	5 min R = 0,5	inactive

Sensitivity of cells to the BVD virus:

Product	dilution	Organic soil load		Dilutions								
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	10^{-3}	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	Cells non treated	4444	4444	4444	4444	4444	3333	2212	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	0000	0000
			Cells treated	4444	4444	4444	4444	4444	3222	0111	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4443	1011	1210	0000	0000

TEST REPORT

VIRUCIDAL QUANTITATIVE SUSPENSION TEST USING HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS ON SURFALKAN SH PRODUCT

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

Study number: 88V53-2011

VIRUCIDAL TESTS:

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

Tests using the SURFALKAN SH product against the Human Immunodeficiency Virus (HIV).

This test report included 13 pages.

Study completion date: 10-03-2011

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 10 000 €

SUMMARY

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

1 PERFORMING LABORATORY

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 BESANÇON

2 PRODUCT IDENTITY

SURFALKAN SH

Batch # 2011.02.01.61
Expiration date: 2014.02
Manufacturer: ALKAPHARM
Storage conditions: room temperature
Active substances: 0 %< fatty alcohol ethoxylate < 2,5 %
Appearance of the product: liquid, clear.
Product diluent recommended by the manufacturer for use: none (ready-to-use)
Date of delivery of the product: 04-07-2011
Date of tests: 06-06-2011 to 08-22-2011

3 EXPERIMENTAL CONDITIONS

Temperature used during the assays: 20°C ± 1°C
Titration units: log $TCID_{50}$
Exposure time: 5 minutes
Diluent used for the product: distilled sterile water
Viral strain: HIV-1, strain pNL4-3, grown on 1G5 cells, at 37°C, under 5% CO2 atmosphere
Organic soil load: 3 g/l of albumin bovine serum + 3 ml sheep erythrocytes (dirty conditions)
Product stability: white 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 HIV suspension assay = 7,875 log $TCID_{50}$.

4 VALIDATIONS

a) Methodology

The 1G5 cells were exposed to the SURFALKAN SH product and a weak cytotoxic effect was observed at the dilution 10^{-3}.

b) Sensibility assays

The HIV was titrated on cell cultures untreated with the SURFALKAN SH product (indicator cell line), and titrated on cell cultures treated with the SURFALKAN SH product.

	Viral titer (log $TCID_{50}$)		
Product dilution	Untreated cell cultures	Treated cell cultures	**Difference (log $TCID_{50}$)**
SURFALKAN SH 10^{-4}	8,0	7,5	**0,5**

According to the European standard EN 14476 + A1, the SURFALKAN SH product used at the dilution of 10^{-4} does not have an effect on the HIV 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 SURFALKAN SH product:

Product concentration	**Organic soil load**	**Viral titer (log $TCID_{50}$)**	**Difference with the viral suspension assay**
SURFALKAN SH 100 %	3 g/l BSA	Trial 1: 7,375	0,5
		Trial 2 : 7,375	0,5
	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	Trial 1 : 7,5	0,375
		Trial 2 : 7,5	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	7,25	0,5
Inactivation exposure 15 min	6,625	1,125
Inactivation exposure 30 min	6,25	**1,5**

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 1,5 log, indicated that the HIV is inactivated after 30 min of exposure with the 1,4 % formaldehyde solution.

5 VIRUCIDAL ASSAYS

The viral test suspension was titrated at **7,375 log $TCID_{50}$** prior the assays for the SURFALKAN SH product at concentration 100 % (with 3 g/l BSA of organic soil load), **7,5 log $TCID_{50}$** at concentration 100 % (with 3 g/l BSA + 3 g/l sheep erythrocytes of organic soil load)

Trial 1

PRODUCT	Organic soil load	Concentration (v/v)	Time exposure	Temperature	Viral titer (log $TCID_{50}$)	Viral titer reduction
SURFALKAN SH	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	100 %	5 min	20°C	2,5	**5,00**
	3 g/l BSA	100 %	5 min	20°C	2,5	**4,88**

Trial 2

The viral test suspension was titrated at **7,375 log $TCID_{50}$** prior the assays for the SURFALKAN SH product at concentration 100 % (with 3 g/l BSA of organic soil load), **7,5 log $TCID_{50}$** at concentration 100 % (with 3 g/l BSA + 3 g/l sheep erythrocytes of organic soil load)

PRODUCT	Organic soil load	Concentration (v/v)	Time exposure	Temperature	Viral titer (log $TCID_{50}$)	Viral titer reduction
SURFALKAN SH	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	100 %	5 min	20°C	2,625	**4,88**
	3 g/l BSA	100 %	5 min	20°C	2,5	**4,88**

The concentrations of the product demonstrated a virucidal activity on the virus tested if the viral titer reduction is ≥ 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 HIV was of 7,875 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 1,5 log for the HIV.
- The SURFALKAN SH product does not have a cytotoxic effect on the 1G5 cells.
- The dirty conditions (sheep erythrocytes + BSA) do not affect the infectious capacity of the HIV.
- The SURFALKAN SH product does not affect the infectious capacity of the virus: the differences in viral titers between the virus inoculated on 1G5 cells and the virus inoculated on the 1G5 cells treated with the SURFALKAN SH was ≤ 1,0 log (0,5 log).
- The difference between the viral suspension assay titer and the viral suspension titer in the cold shock validation was ≤ 0,5 log (0,5 log trial 1; 0,375 trial 2).

7 CONCLUSIONS

The assays performed with SURFALKAN SH product demonstrated that:

- **the SURFALKAN SH product demonstrated a virucidal activity on the Human Immunodeficiency Virus (HIV) from the concentration 100%,** as required by the European standard EN 14476+A1, following a 5 **minutes** exposure period, at 20°C, in dirty conditions.

TECHNICAL APPENDIX 1

Cell line: 1G5 cells

Viral strain: VIH-1 (strain pNL4-3)

Buffer and reagents:

- Buffer PBS: sodium chloride, Panreac, ref. 141659.1211, batch n° 0000204679; sodium phosphate dibasic, Sigma Aldrich, ref. S5136, batch n° BCBC7067V; sodium phosphate monobasic, Sigma Aldrich, ref. S5011, batch n° 1019K01021V
- MEM media, Sigma Aldrich, ref. M0268, batch n° 040M8301
- DMEM media, Sigma Aldrich, D5796, batch n° RNBB9336
- Fetal calf serum, Sigma Aldrich, ref. F7524, batch n° 098K3397

Organic soil load:

- Bovine albumin serum (powder), Sigma Aldrich, ref. A7906, batch n° STBB7838V
- Sheep erythrocytes, Oxoïd, ref. n° SR0050C, batch n° 34298000

Inactivation solution:

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

TECHNICAL APPENDIX 2

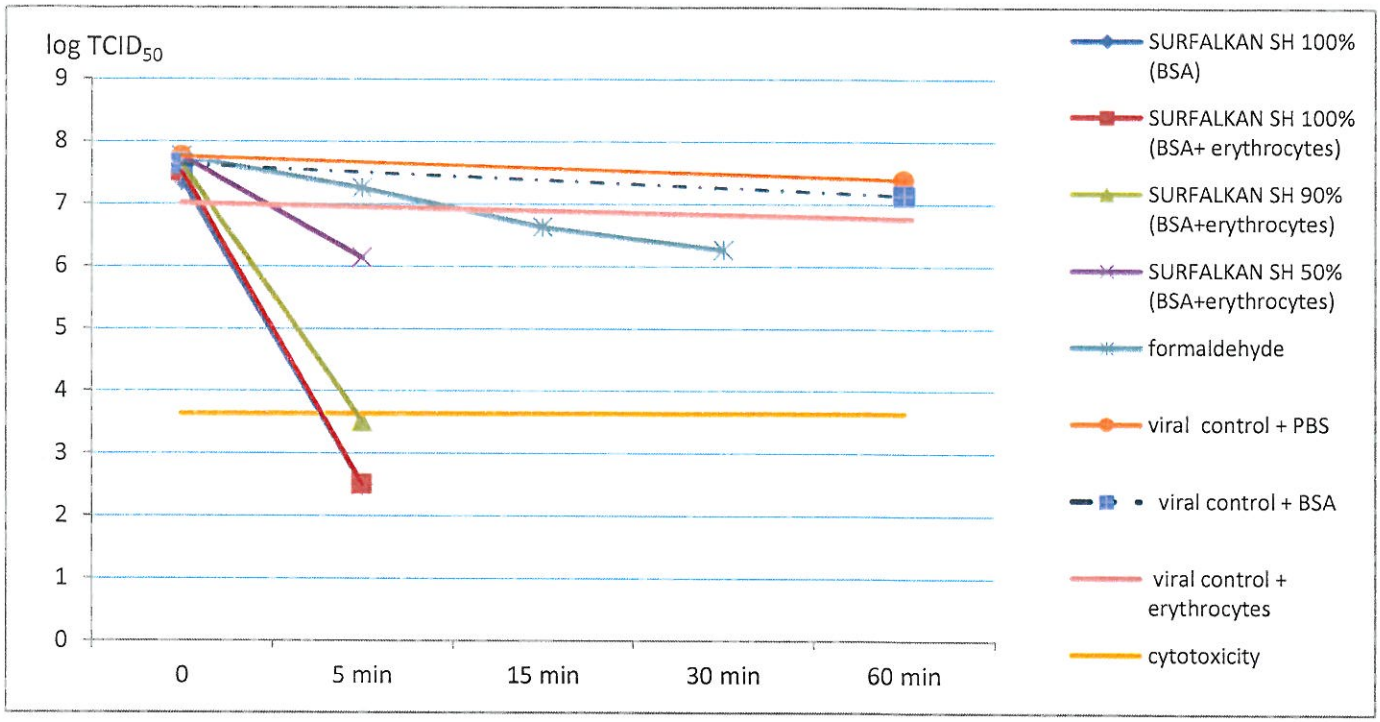
Table A1 - Titration of HIV by cytopathic effect, with the Spaerman-Kärber method :

log $TCID_{50}$ = 7,875

Dilution (- log)	Results	% positive results
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	33344333	100
-6	33333333	100
-7	22022222	87,5
-8	01011100	50
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Sum of the positives results		537,5

Fig.1- Chart of the results:

Trial 1



Trial 2

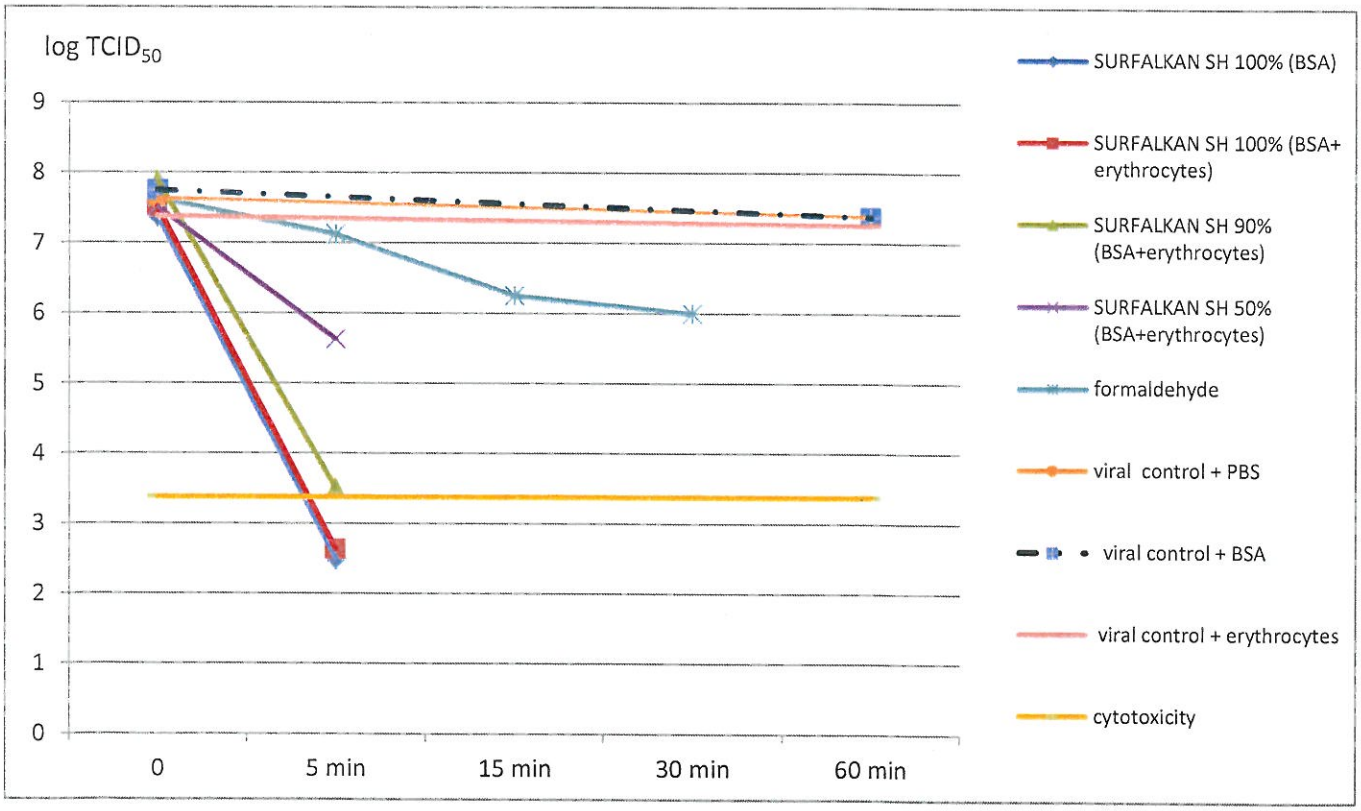


Table A2 — results for the SURFALKAN SH product and the HIV in dirty conditions (3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes)

Product	Concentration	Organic soil load	Cytotoxicity level	Lg $TCID_{50}$					Reduction
				0	5 min	15 min	30 min	60 min	
SURFALKAN SH assay 1	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	3,625	7,5	2,5	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R =5
	100,00%	3 g/l BSA	3,625	7,375	2,5	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R=4,875
SURFALKAN SH assay 2	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	3,375	7,5	2,625	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R=4,875
		3 g/l BSA	3,375	7,375	2,5	N.T.	N.T.	N.T.	5 min R=4,875
Formaldehyde assay 1	1,40%	PBS	3,5	7,75	7,25	6,625	6,25	N.T.	
Formaldehyde assay 2	1,40%	PBS	3,5	7,625	7,125	6,25	6	N.T.	
Infectivity control assay 1	N.A.	PBS	N.A.	7,75	N.T.	N.T.	N.T.	7,375	
Infectivity control assay 1	N.A.	3 g/l BSA	N.A	7,625	N.T.	N.T.	N.T.	7,125	
Infectivity control assay 1	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	N.A	7	N.T.	N.T.	N.T.	6,75	
Infectivity control assay 2	N.A.	PBS	N.A	7,625	N.T.	N.T.	N.T.	7,375	
Infectivity control assay 2	N.A.	3 g/l BSA	N.A	7,75	N.T.	N.T.	N.T.	7,375	
Infectivity control assay 2	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	N.A	7,375	N.T.	N.T.	N.T.	7,25	
Cells sensitivity to the virus	SURFALKAN SH 10-4	N.A.	Untreated cells	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	8	
		N.A.	Treated cells	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7,5	

N.A. : Non Applicable N.T. : Non tested

Table A3 — Raw data for SURFALKAN SH product (3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes) tested against the HIV (titration by cytopathic effect; 8 wells)

Assay 1

	Concentration	organic soil load	Time exposure	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	5 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	3333	3322	1112	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3433	2222	1111	0000	0000	0000
	100,00%	3 g/l BSA	5 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	3334	1221	1011	0100	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000	0000
SURFALKAN SH cytotoxicity	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	N.A.	4444	4444	4444	1000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4343	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
Formaldehyde	1,40%	PBS	5	4444	4444	4444	3323	2223	2222	1210	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	3331	2222	2222	0112	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	3443	3333	1122	1000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	3332	2221	2220	0100	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	3333	2222	1011	1000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	3333	1122	1100	0000	0000	0000	
Formaldehyde (cytotoxicity)	1,40%	PBS	N.A.	4444	4444	4444	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	4444	3324	0000						
Infectivity control	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	3332	2112	1010	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	0000	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	3343	2233	1011	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3443	2222	1111	0000	0000	0000
Infectivity control	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	2222	1111	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	2222	1111	0100	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4333	2222	0010	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	2221	1111	0000	0000	0000
Infectivity control	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	0	4444	4444	4444	4444	3333	2221	1100	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	2121	1010	0000	0000	0000
			60	4444	4444	3333	3333	2222	1111	1000	0000	0000	0000
				4444	4444	3333	3333	2221	1111	1000	0000	0000	0000

Assay 2

	Concentration	organic soil load	Time exposure	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	5 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	0100	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	3333	3333	2212	1111	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	2333	2222	1111	0000	0000	0000
	100,00%	3 g/l BSA	5 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	2333	2221	1111	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	3333	3333	1111	1110	0000	0000	0000
SURFALKAN SH cytotoxicity	100,00%	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	N.A.	4444	4444	3333	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
				4444	3333	3033	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
Formaldehyde	1,40%	PBS	5	4444	4444	4444	3333	2223	1122	1100	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4333	2222	2222	1110	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	3222	2222	1110	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	2222	2222	1110	0000	0000	0000	
			30	4444	4444	3333	2333	1111	1111	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	3433	3333	1111	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	4343	3333	0000						
Infectivity control	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	4333	2222	1000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3323	2122	0000	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	3333	3333	2110	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3434	3333	1111	0000	0000	0000
Infectivity control	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	3443	3222	1111	1000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	2222	1111	0100	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	3333	2222	3011	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	3233	1111	0000	0000	0000
Infectivity control	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	0	4444	4444	4444	4444	3333	2322	1111	1000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	2222	1010	0000	0000	0000
			60	4444	4444	4444	3333	2222	1111	1111	1000	0000	0000
				4444	4444	4444	3333	2222	1111	1000	0000	0000	0000

Validations:

Product	Concentration	Organic soil load	Time exposure	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	90% assay 1	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	5 min	4444	4444	3344	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	3333	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	3333	3333	2111	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	2333	1101	1100	0000	0000
SURFALKAN SH	90% assay 2	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	5 min	4444	4444	3333	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	3344	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	3433	2222	1111	0100	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4344	1222	1211	1100	0000	0000
SURFALKAN SH	50% assay 1	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	5 min	4444	4444	4444	3444	2111	1111	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4333	1111	0100	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	3333	2222	2111	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	2332	2333	1111	1001	0000	0000
SURFALKAN SH	50% assay 2	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	5 min	4444	4444	4444	3222	2222	0100	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	3222	2222	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	4444	3334	2222	1111	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	2221	1111	0000	0000	0000

Product	Concentration	Organic soil load	cytotoxicity level	Lg $TCID_{50}$		Reduction > 4 lg after
				0	5 min	
SURFALKAN SH	90% assay 1	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	3,625	7,625	3,5	5 min R = 4,125
	90% assay 2	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	3,375	7,875	3,5	5 min R = 4,375
	50% assay 1	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	3,625	7,75	6,125	5 min R = 1,625
	50% assay 2	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	3,375	7,5	5,625	5 min R = 1,875

Sensitivity of cells to the HIV

Product	dilution	Organic soil load		Dilutions								
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
SURFALKAN SH	10^{-4}	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	Untreated cells	4444	4444	4444	4444	3333	2222	1100	0000	0000
				4444	4444	4444	3333	2322	1111	1001	0000	0000
			Treated cells	4444	4444	4444	3333	2222	1011	1000	0000	0000
				4444	4444	4444	3334	2222	1111	0000	0000	0000

scientis

RAPPORT D'ESSAI
003-REA-11 ST CN1 AN

Seule la version française fait foi / Only the French version is valid

Test according to the NF EN 13697 (November 2001) standards

Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas.
Test method and requirements without mechanical action (Phase 2, Step 2)

Test on one additional strain: Clostridium difficile
This report includes 5 pages and relates only the sample tested.

I. Sample Identification

Name of the product:	**SURFALKAN SH**
Batch number:	2011.06.01.61
Manufacturer:	SODEL ZI Nord Est – Rue Renée Barthélémy 14100 LISIEUX cedex FRANCE
Date of delivery :	11/08/2011
Storage conditions:	According to the manufacturer's recommendations
Product diluents recommended by the manufacturer for use	None – Ready to use
Active substance(s):	Fatty alcohol ethoxylates Alkylbenzyl dimethyl ammonium chloride
Appearance of the product:	Clear liquid

II. Completion of the test

II.1. Subcontractor laboratory identification

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 BESANCON

This laboratory complies with Good Laboratory Practices and is involved in a quality approach in accordance with the NF EN ISO/CEI 17025 v2005 standard.

II.2. Reference of test report:

N° 206B53-2011 delivered by APEX BIOSOLUTIONS on 16/10/2011

N° 003-REA-11 ST CN1 AN delivered by SCIENTIS on 02/12/2013

Scientis is one of the commission members T72Q – Antiseptics and chemical disinfectants and is involved in a quality approach in accordance with the NF EN ISO/CEI 17025 v2005 standard.

III. Principle of the test

The purpose of the test according to the NF EN 13697 (2001) standard is to draw attention to a reduction in the number of microorganisms, when these come into contact with the test product under conditions specified below.

This test conducted on stainless steel discs is used to ascertain a bactericidal activity if the reduction rate is 10^4 or more.

IV. Experimental conditions

NF EN 13697 (2001)	**SURFALKAN SH**	Batch: 2011.06.01.61
Test period:	from 01/09/2011 to 03/10/2011	
Test temperature:	20°C +/-1°C	
Contact time:	**5 minutes**	
Test microorganism:	*Clostridium difficile* (CIP 104282; batch 6507)	
Product diluent:	Distilled water	
Diluent used for product test solutions: tryptone sodium chloride sterile solution		
Appearance of product test solutions : clear, white		
Dilution neutralization method:	technical stop the bactericidal activity	
Neutralizer:	5% lecithin, 30g/l polysorbate 80 and 30g/l saponin	
Pour plate		
Counting agar:	*Clostridium difficile* agar with horse blood	
Incubation:	37°C +/-1°C for 36 to 48h in anaerobic conditions	
Interfering substances:	**Dirty conditions (bovin albumin 3g/l)**	
Product stability with distilled water:	stable	
Surfaces:	Stainless steel discs 2 cm diameter 1.4301	

Concentrations of the product tested: 10%; 50% and 100% (final concentration 80%)

V. Results of the test (Tests were repeated twice.)

Test n°1

a. Test suspension

Strain (Collection and number)	*Clostridium difficile* CIP 104282
N	**7,15**

N = logarithm of the CFU number of the test microbial suspension

b. Validation and controls

Strain (Collection and number)	Water control Nc	Neutralizer control NC	Neutralizer test NT
Clostridium difficile CIP 104282	**7,05**	**6,42**	**6,45**

Nc = logarithm of the CFU number by test surface for the water control
NC = logarithm of the CFU number by test surface for the neutralizer control
NT = logarithm of the CFU number by test surface for the neutralizer test

N-NC is inferior or equal to $2\log_{10}$
NC-NT is inferior or equal to ±0,3
N-Nc is inferior or equal to $2\log_{10}$

The method is validated in the test conditions.

c. Test

		Number of viable cells (Nd) and reduction rate (ME) for the concentrations of product tested		
Strain (Collection and number)		10%	50%	100%
Clostridium difficile CIP 104282	Nd	4,46	3,08	<0,1
	Nts	>300	82	2
	ME	**2,59**	**3,97**	**>6,95**

Nd = logarithm of the CFU number by test surface for the test with the tested product
Nts = number of CFU still on the test surface
ME = microbicidal effect

ME = Nc - Nd
A concentration is bactericidal if ME ≥ 4

Test n°2 : repetition

a. Test suspension

Strain (Collection and number)	*Clostridium difficile* CIP 104282
N	**7,14**

N = logarithm of the CFU number of the test microbial suspension

b. Validation and controls

Strain (Collection and number)	Water control Nc	Neutralizer control NC	Neutralizer test NT
Clostridium difficile CIP 104282	**7,18**	**7,08**	**7,0**

Nc = logarithm of the CFU number by test surface for the water control
NC = logarithm of the CFU number by test surface for the neutralizer control
NT = logarithm of the CFU number by test surface for the neutralizer test

N-NC is inferior or equal to $2\log_{10}$
NC-NT is inferior or equal to ±0,3
N-Nc is inferior or equal to $2\log_{10}$

The method is validated in the test conditions.

c. Test

		Number of viable cells (Nd) and reduction rate (ME) for the concentrations of product tested		
Strain (Collection and number)		10%	50%	100%
Clostridium difficile CIP 104282	Nd	4,50	3,25	<0,1
	Nts	>300	56	0
	ME	**2,68**	**3,94**	**>7,08**

Nd = logarithm of the CFU number by test surface for the test with the tested product
Nts = number of CFU still on the test surface
ME = microbicidal effect

ME = Nc - Nd
A concentration is bactericidal if ME ≥ 4

VI. Summary of log reductions obtained

On average, after two repetitions:

Log reductions	In 5 minutes contact time
Clostridium difficile CIP 104282	**lgR > 7,02 for 100% concentration product**

VII. Conclusion

According to the EN 13697 standard,the batch **2011.06.01.61** of the product **SURFALKAN SH**, used at **100%** (v/v) in distilled water, presents bactericidal activity on surfaces in **5 minutes contact time** at 20°C, in dirty conditions, against the strain *Clostridium difficile*.

Romainville, December 02nd, 2013

Corinne BENOLIEL
Doctor of pharmacy
Scientific Director

MERIEUX NutriSciences

CHELAB S.R.L.

TEST REPORT N. 20/000149036

date of issue 21/04/2020

Customer ID 0081548

Messrs
SODEL
190 RUE REN BARTH L MY
14100 LISIEUX
Francia

Sample information

Acceptance number 19.529590.0004

Delivered by The Courier on 19/09/2019

Receiving Date 19/09/2019

Place of origin SODEL 190 RUE REN BARTH L MY 14100 LISIEUX Francia

Sample Description F2496

Sampling information

Sampled by Customer

ANALYTICAL RESULTS

	Value/ Uncertainty	Unit of measure	LoQ	LoD	Start/end date of analysis	Op. units	Line
ON SAMPLE AS IT IS							1
VIRUCIDAL ACTIVITY ON NON-POROUS SURFACE Met.: PR NF EN 16777:2014	view attached report				20/09/2019- -21/04/2020	09	2

Operative units

Unit 09 : Via Fratta Resana PHARMA (TV)

Information provided by the client

Sampled by: Customer
Pick Address: SODEL 190 RUE REN BARTH L MY 14100 LISIEUX Francia
Description: F2496

Chemical responsible
Dott.ssa Barbara Scantamburlo Chimico Ordine dei Chimici e dei Fisici - Provincia di Treviso Iscrizione n. A351
Num. certificato 21005078 emesso dall ente certificatore ArubaPEC S.p.A. NG CA 3, ArubaPEC S.p.A., IT

Report digitally signed in accordance with Legislative Decree No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i
The results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. The 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.

- If not otherwise specified, the uncertainty is extended and has been calculated with a coverage 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.). - In case of alteration of the sample the laboratory declines any responsibility on the results that can be influenced by the deviation in case the customer asks for the execution of the test anyway. - If the sampling is not carried out by the laboratory staff, the results obtained are considered referring to the sample as received and the laboratory declines its responsibility for the results calculated considering the sampling data provided by the Customer. The name and contact information of the Customer are always provided by the Customer.

END OF TEST REPORT

Report digitally signed in accordance with Legislative Decree No.82 of March, the 7th, 2005 and s.m.i

The results contained in this Test Report refer only to the analyzed sample. The 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.

UNI EN 16777:2019

QUANTITATIVE NON-POROUS SURFACE TEST WITHOUT MECHANICAL ACTION FOR THE EVALUATION OF VIRUCIDAL ACTIVITY OF CHEMICAL DISINFECTANT USED IN THE MEDICAL AREA

TEST PRODUCT F2496

Sample ID:	*19.529590.0004*
Description:	*F2496, Lot. n° F2496190916A*
Ref. AR:	*AR 2019/205/A CAP.2*
Starting date:	*30/09/2019*
Report emission date:	*21/04/2020*
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: F2496
- Batch n°: F2496190916A
- Manufactured: n.a.
- Expiry date: n.a.
- Receiving date: 20/09/2019
- Storage condition: room temperature
- Product appearance: liquid, colorless
- Active substance and concentration: ALCOOL EHYLIQUE (CAS 64-17-5), ALCOOL GRAS ETHOXYLE C9-C11 (CAS 68439-46-3), DIPROPYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER (CAS 34590-94-8), CHLORURE D'ALKYL C12-C16 DIMETHEL BENZYL AMMONIUM (CAS 68424-85-1)

EXPERIMENTAL CONDITIONS

- Test virus and number of passages:
  Vaccinia virus, strain Ankara, ATCC-VR-1508 (passage n° 6)
- Cell line and number of passages:
  BHK-21-cl 13, IZS-Brescia for the propagation of Vaccinia virus (passage n° 93+6)
- Product test concentrations: product as it is (100%)
- Stability and appearance of the mixture during the procedure: Stable, without precipitates
- Interfering substance: Albumin Bovine 3 g/l + 3 ml/l erythrocytes (dirty conditions)
- Contact times: 5 min ± 10 sec; 10 min ± 10 sec
- Test temperature: Room Temperature (between 18 ± 1 °C and 25 ±1 °C)
- Neutralization method: Filtration method with Microspin™ S400HR columns was applied during the test procedure. Notably, because of interference caused by volatile substances contained in the test product, filtration method was applied also during the procedure for testing cell susceptibility.
- Growth medium: EMEM, 10% FCS, 2 mM Glutamine, 1 mM Sodium Pyruvate,1% Pen-Strep mix.
- Maintenance medium: EMEM, 2% FCS

TEST RESULTS

See tables n° 1 to 2.

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 1: Results of the test UNI EN 16777:2019 on Vaccinia virus contact time 5 min and 10 min

VIRUS	TEST	CONTACT TIME	SAMPLE	VIRUS TITRATION $logTCID_{50}$	ACCEPTANCE CRITERIA	RESULT
VACCINIA VIRUS	TITRATION OF VIRUS CONTROL	0 min	n.a.	6.125	/	/
		10 min	n.a.	6.5	/	/
	PRELIMINARY CYTOTOXICITY EFFECT	n.a.	DONE			
	CELL SUSCEPTIBILITY	n.a.	CONTROL	6.375	< 1	R = 0.125 PASS
			0.1%*	6.25		
	EFFICIENCY FOR SUPPRESSION OF DISINFECTANT ACTIVITY	n.a	100 %	6.625	≤ 0.5	R = 0.125 PASS
	VIRUCIDAL ACTIVITY	5 min	100 %	2.5	R ≥ 4	R = 4 ACTIVE
		10 min	100 %	2.5	R ≥ 4	R = 4 ACTIVE
	REFERENCE VIRUS INACTIVATION TEST	5 min	n.a.	3.625	R < 3	R = 2.875 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.
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 2: Raw data of the test UNI EN 16777:2019 on Vaccinia virus contact time 5 min and 10 min

Test	Contact Time	Interfering substance	Concentration		dilutions log_{10}							
					2	3	4	5	6	7	8	9
TITRATION OF VIRUS CONTROL	0 min	BSA 3 g/l + DSB 3 ml/l	/		4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4440	4444 4400	0000 0000	0000 0000	0000 0000
	10 min		/		4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0000	0000 0000	0000 0000
EFFICIENCY FOR SUPPRESSION OF DISINFECTANT ACTIVITY	/	BSA 3 g/l + DSB 3 ml/l	100 %		4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
VIRUCIDAL ACTIVITY	5 min	BSA 3 g/l + DSB 3 ml/l	100%	R1	4444 4444	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
				R2	4444 4444	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
	10 min	BSA 3 g/l + DSB 3 ml/l	100%	R1	4444 4444	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
				R2	4444 4444	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
Reference Inactivation Test	5 min	/	50 ppm		4444 4444	4444 4444	4000 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 4440	4000 0000	0000 0000	0000 0000
Susceptibility (Product)	60 min	PBS	0.1%		4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4400	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)	n.a.	BSA 3 g/l + DSB 3 ml/l	100%		CCCC CCCC	CCCC CCCC	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000

R1: Test surface 1; R2: Test surface 2; n.a.: not applicable; C: cytotoxic

CONCLUSIONS

Based on UNI EN 16777:2019, under the test conditions applied, the test product resulted to have virucidal activity (R ≥ 4) against Vaccinia virus.

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.

scientis

TEST REPORT
002-REA-12 ST AN

Seule la version française fait foi / Only the French version is valid

Test according to the NF EN 13704 (April 2002) standard
Chemical disinfectants
Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas.
Test method and recommendations (Phase 2, step 1)

Test on one additional strain: Clostridium difficile spores
This report includes 5 pages and relates only the sample tested.

I. Sample Identification

Name of the product:	**SURFALKAN SH**
Batch number:	2011.06.01.61
Sponsor :	ALKAPHARM Parc Biocitech - 102 avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE
Manufacturer:	ALKAPHARM Parc Biocitech - 102 avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE
Date of delivery :	11/08/2011
Storage conditions:	According to the manufacturer's recommendations
Product diluents recommended by the manufacturer for use	None – Ready to use
Active substance(s):	Fatty alcohol ethoxylates Alkylbenzyl dimethyl ammonium chloride
Appearance of the product:	Clear liquid

II. Completion of the test

II.1. Subcontractor laboratory identification

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 BESANCON

This laboratory complies with Good Laboratory Practices and is involved in a quality approach in accordance with the NF EN ISO/CEI 17025 v2005 standard.

II.2. Reference of test report:

N° 326B60-2011 delivered by APEX BIOSOLUTIONS on le 09/01/2012

N° 002-REA-12 ST AN delivered by SCIENTIS on 02/12/2013

Scientis is one of the commission members T72Q – Antiseptics and chemical disinfectants and is involved in a quality approach in accordance with the NF EN ISO/CEI 17025 v2005 standard.

III. Principle of the test

The purpose of the test according to the NF EN 13704 standard (2002) is to draw attention to a reduction in the number of microorganisms, when these come into contact with the test product under conditions specified below.

This test conducted under suspension conditions is used to ascertain a sporicidal activity if the reduction rate is 10^3 or more.

IV. Experimental conditions

NF EN 13704 (2002)	**SURFALKAN SH**	Batch : 2011.06.01.61

Test period: from 12/12/2011 to 06/01/2012
Test temperature: 20°C +/-1°C
Contact time: **15 minutes, 30 minutes and 60 minutes**
Test microorganism: *Clostridium difficile* CIP 104282
Product diluent: Distilled water
Diluent used for product test solutions: tryptone sodium chloride sterile solution
Appearance of product test solutions : clear
Dilution neutralization method: technical stop the sporicidal activity
Neutralizer: polysorbate 80, tryptocasein soya broth and yellow egg 5%
Pour plate
Counting agar: Resazurin agar and *Clostridium difficile* agar with horse blood
Incubation: 37°C +/-1°C in anaerobic conditions
Interfering substances: **Dirty conditions (bovin albumin 3g/l)**
Product stability with distilled water: stable
Concentration of the product tested: 100% (final concentration 80%) and 10%

V. Results of the test (Tests were repeated twice.)

Test n°1

a. Test suspension

Strain (Collection and number)	Test Suspension (N)	lg N	N_0 (= N / 10)	lg N_0
Clostridium difficile CIP 104282	$1,70 \times 10^6$	6,23	$1,70 \times 10^5$	5,23

N is between 1.5×10^6 and 5.0×10^6 CFU/ml (log N between 6,17 and 6,70)
N_0 is between $1,5 \times 10^5$ and $5,0 \times 10^5$ CFU/ml (log N_0 between 5,17 and 5,70)

b. Validation and controls

Strain (Collection and number)	Bacterial suspension for validation (N_v)	Control of experimental conditions (A)	Validation of the neutralising agent (B)	Validation of the method (C)
Clostridium difficile CIP 104282	1690	140	123	142

N_v is between 600 and 3000 CFU/ml
A and B are greater than or equal to $0.05 \times N_v$
C is greater than or equal to 0.5 x B

The method is validated in the test conditions.

c. Test

		Number of viable cells (Na) and reduction rate (R) To the 10% concentration de 10% and in tested contact times			Number of viable cells (Na) and reduction rate (R) For the pure product (80%) and in tested contact times		
Strain (Collection and number)		15 min	30 min	60 min	15 min	30 min	60 min
Clostridium difficile CIP 104282	Na	>3000	>3000	1920	<150	<150	<150
	lg Na	>3,48	>3,48	3,28	<2,18	<2,18	<2,18
	lg R	**<1,75**	**<1,75**	**1,95**	**>3,05**	**>3,05**	**>3,05**

lg R = lg N_0 - lg Na
A concentration is sporicidal if lgR ≥ 3

Test n°2 : repetition

a. Test suspension

Strain (Collection and number)	Test Suspension (N)	lg N	N_0 (= N / 10)	lg N_0
Clostridium difficile CIP 104282	$2,15 \times 10^6$	6,33	$2,15 \times 10^5$	5,33

N is between 1.5×10^6 and 5.0×10^6 CFU/ml (log N between 6,17 and 6,70)
N_0 is between $1,5 \times 10^5$ and $5,0 \times 10^5$ CFU/ml (log N_0 between 5,17 and 5,70)

b. Validation and controls

Strain (Collection and number)	Bacterial suspension for validation (N_v)	Control of experimental conditions (A)	Validation of the neutralising agent (B)	Validation of the method (C)
Clostridium difficile CIP 104282	1800	168	133	157

N_v is between 600 and 3000 CFU/ml
A and B are greater than or equal to $0.05 \times N_v$
C is greater than or equal to 0.5 x B

The method is validated in the test conditions.

c. Test

		Number of viable cells (Na) and reduction rate (R) To the 10% concentration de 10% and in tested contact times			Number of viable cells (Na) and reduction rate (R) For the pure product (80%) and in tested contact times		
Strain (Collection and number)		15 min	30 min	60 min	15 min	30 min	60 min
Clostridium difficile CIP 104282	Na	>3000	>3000	1785	<150	<150	<150
	lg Na	>3,48	>3,48	3,25	<2,18	<2,18	<2,18
	lg R	**<1,85**	**<1,85**	**2,08**	**>3,15**	**>3,15**	**>3,15**

lg R = lg N_0 - lg Na
A concentration is sporicidal if lgR ≥ 3

VI. Summary of log reductions obtained

On average, after two repetitions:

Log reductions	In 15, 30 and 60 minutes contact time
Clostridium difficile CIP 104282	**Log R >3,10 for the pure product (final concentration 80%)**

VII. Conclusion

According to the EN 13704 standard, the batch **2011.06.01.61** of the product **SURFALKAN SH**, ready-to-use, presents sporicidal activity from **15 minutes contact time** at 20°C, in dirty conditions, against the strain *Clostridium difficile*.

Romainville, December 02nd, 2013

Corinne BENOLIEL
Docteur en pharmacie
Directrice scientifique