



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

EVALUATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE DE QUATRE SURFACES PLASTIQUES SELON UNE METHODOLOGIE BASEE SUR LES NORMES JIS Z 2801 : 2000 ET JIS Z 2801 : 2006

Rapport rédigé par : Dr Marlène RICHARD

Marseille: le 14 novembre 2008

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SARL au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT****TABLE DES MATIERES**

I :	DESCRIPTION DE L'ÉTUDE :	3
II :	OBJECTIF DE L'ETUDE :	3
III :	MATÉRIEL :	3
a)	Surfaces antimicrobiennes :	3
b)	Souche d'essai :	3
c)	Culture cellulaire :	4
d)	Diluant, milieu de culture et solution de récupération :	4
IV :	MÉTHODE :	4
a)	Suspension d'essai :	4
b)	Contamination des surfaces à tester :	4
c)	Incubation des surfaces contaminées :	4
d)	Détermination du niveau de contamination des surfaces tests :	4
e)	Conditions d'essai :	5
f)	Expression de l'activité virucide :	5
V :	RÉSULTATS :	6
a)	Validation des conditions d'essai :	6
b)	Essais proprement dits :	6
VI :	CONCLUSIONS :	7
VII :	RÉFÉRENCES :	7

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SARL au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT****I : DESCRIPTION DE L'ETUDE:**

Intitulé:	Evaluation de l'activité virucide de quatre surfaces plastiques selon une méthodologie basée sur les normes JIS Z 2801: 2000 et JIS Z 2801: 2006.
Référence interne:	Etude n° 546.LEG.07
Commanditaire :	LEGRAND 128, av. du Maréchal de Lattre de Tassigny 87045 Limoges Cedex <i>Contact: Mr. HASBROUCK</i>
Période d'essai:	24/04/2008 au 06/11/2008.
Responsable étude :	Dr Marlène RICHARD
Laboratoire d'essai :	Laboratoire FONDEREPHAR Laboratoire de bactériologie, virologie et Microbiologie Industrielle

II : OBJECTIF DE L'ETUDE :

Déterminer dans les conditions expérimentales décrites dans les normes JIS Z 2801: 2000⁽¹⁾ et JIS Z 2801: 2006⁽²⁾, la capacité de surfaces plastiques à réduire en 24 heures à 35±1°C, d'au moins 10² fois le nombre d'unités infectieuses de l'*Enterovirus type I*.

III : MATERIEL :**a) Surfaces antimicrobiennes et surfaces témoins :**

3 surfaces en polycarbonate avec agent antimicrobien.
6 surfaces témoins en polycarbonate sans agent antimicrobien

3 surfaces ABS avec agent antimicrobien.
6 surfaces témoins ABS sans agent antimicrobien.

3 surfaces en polypropylène avec agent antimicrobien.
6 surfaces témoins en polypropylène sans agent antimicrobien

3 surfaces de SEBS avec agent antimicrobien.
6 surfaces témoins de SEBS sans agent antimicrobien

b) Souche d'essai :

Enterovirus type I :AFSSAPS lot n° NIBSC 01/528

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande
BIOTECH-GERMANDE

SARL au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT****c) Culture cellulaire :**

Cellules VERO -----ATTC CLL-81, batch n° 3372621

Les conditions de conservation et de contrôle de la souche utilisée pour la détermination de l'activité virucide est celle décrite dans la norme Française NF EN 14476 + A1 : 2007.

d) Diluant, milieu de culture et solution de récupération :

EMEM à 2% de sérum de veau fœtal (SVF).

IV : METHODE :**a) Suspension d'essai :**

Le titre de la suspension virale est ajustée entre 5,6 log DICT₅₀ et 6,0 log DICT₅₀ dans du milieu de culture EMEM à 2% de SVF.

b) Contamination des surfaces à tester :

Pour chaque nature de surface test, 3 surfaces avec agent antimicrobien et 6 surfaces sans antimicrobien, sont placées dans une boîte de Pétri, la face greffée exposée vers le haut. 480 µl du film viral sont déposés sur chacune des surfaces puis recouverts par une lame de verre de 50 x 50 mm.

c) Incubation des surfaces contaminées :

Après contamination, les 3 surfaces avec agent antimicrobien et 3 des six surfaces sans agent antimicrobien sont incubées à 36 ± 1°C pendant 24 ± 1 heures. Parallèlement, les 3 autres surfaces sans agent antimicrobien sont traitées immédiatement afin de déterminer le niveau de contamination initial des surfaces.

d) Détermination du niveau de contamination des surfaces tests :

Immédiatement après la contamination ou après incubation des surfaces, le titrage des virus viables résiduels présents sur la surface est effectué. Pour cela, le film viral est récupéré par addition de 10 ml d'une solution neutralisante (milieu de culture EMEM + 2% SVF) par grattage doux à l'aide d'un grattoir pour cellules.

La technique de titrage est celle indiquée dans la norme NF EN 14476 + A1 : 2007. Des dilutions de raison 4 des suspensions virales sont réalisées dans le milieu de culture cellulaire EMEM en tubes de verre neutre afin de limiter les phénomènes d'adsorption des virus sur les surfaces.

Le titrage est effectué sur microplaques de 96 puits.

L'effet cytopathique est déterminé après 48 heures de culture et l'estimation du nombre d'unités infectieuses est déterminée par la méthode de SPAERMAN-KARBER en calculant le logarithme négatif du point limite 50% (log DICT₅₀) par la formule suivante :

$\text{Log DICT}_{50} = \text{Logarithme négatif de la plus haute concentration de virus utilisée} - [(\text{Somme de \% affecté à chaque dilution}/100 - 0,5) \times (\text{log de dilution})]$.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SARL au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9

Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****H Y G I E N E - F O R M A T I O N - E V A L U A T I O N**
R E C H E R C H E & D E V E L O P P E M E N T**e) Conditions d'essai :**

Conformément aux exigences de la norme JIS Z 2801: 2000⁽¹⁾, les essais sont jugés satisfaisants si les conditions d'essai suivantes sont remplies :

i) Titre viral sur la surface immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien :

$$(T_{\max} - T_{\min}) / (T_{\text{moyen}}) \leq 0,2$$

Avec T_{\max} : Titre viral maximum sur la surface;

T_{\min} : Titre viral minimal sur la surface;

T_{moyen} : Titre viral moyen sur la surface pour les trois surfaces test sans agent antimicrobien.

ii) Le titre viral moyen immédiatement présents après la contamination des surfaces test sans agent antimicrobien doit être compris entre $1,0 \cdot 10^5$ ($5,0 \log_{10}$) et $4,0 \cdot 10^5$ unité infectieuse/surface ($5,6 \log_{10}$).

iii) Le titre viral sur chacune des surfaces test sans agent antimicrobien incubées 24 heures ne doit pas être inférieur à $1,0 \cdot 10^4$ unité infectieuse/surface ($4 \log_{10}$).

f) Expression de l'activité virucide :

Lorsque les conditions d'essai sont validées, l'activité virucide des surfaces test est déterminée en utilisant la formule suivante :

$$R = [\log (B/A) - \log (C/A)] = [\log (B/C)]$$

Avec R : La valeur de l'activité virucide ou facteur de réduction ;

A : Nombre moyen de doses infectantes virales 50% (DICT₅₀) immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien ;

B : Nombre moyen de doses infectantes virales 50% (DICT₅₀) après 24 heures d'incubation sur les surfaces sans agent antimicrobien ;

C : Nombre moyen de doses infectantes virales 50% (DICT₅₀) après 24 heures d'incubation sur les surfaces avec agent antimicrobien.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SARL au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9

Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE**HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT**V : RESULTATS :****a) Validation des conditions d'essai :**

Tableau I : Validation des titres viraux présents sur la surface immédiatement après contamination des surfaces en plastiques sans agent antimicrobien : $(T_{\max} - T_{\min}) / (T_{\text{moyen}}) \leq 0,2$. T_{\max} : titre viral maximum ; T_{\min} : titre viral minimal ; T_{moyen} : moyenne des titres viraux pour les trois surfaces test sans agent antimicrobien.

	Essai 1 (T_{\max})	Essai 2 (T_{\min})	Essai 3	T_{moyen}	$(T_{\max} - T_{\min}) / (T_{\text{moyen}})$
Surface en polycarbonate	5,4	5,1	5,3	5,3	0,06
Surface ABS	5,3	5,1	5,2	5,2	0,04
Surface en polypropylène	5,1	5,1	5,1	5,1	0,00
Surface SEBS	5,0	5,1	5,0	5,0	0,02

Pour chaque microorganisme test :

- ✓ $(T_{\max} - T_{\min}) / (T_{\text{moyen}})$ est inférieur à 0,2 (tableau I) ;
- ✓ Les charges virales moyennes immédiatement présentes après la contamination des surfaces test sans agent antimicrobien sont bien comprises entre $5,0 \log_{10}$ ($1,0 \cdot 10^5$ UI/surface) et $5,6 \log_{10}$ ($4,0 \cdot 10^5$ UI/surface) d'*Enterovirus type 1*.

Les conditions d'essais sont donc considérées comme valides pour chaque type de surface soumis à l'essai.

b) Essais proprement dits :

Tableau II : Evaluation de l'activité virucide des surfaces plastiques vis-à-vis de l'*Enterovirus type 1* pour un temps de contact de 24 ± 1 heures à $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Log A : Log DICT₅₀ sur la surface test immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien ; log B : Log DICT₅₀ sur la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces sans agent antimicrobien ; log C : Log DICT₅₀ sur la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces avec agent antimicrobien ; R : activité virucide.

	Log A	Log B	Log C	R [Log B - Log C]
Surface en polycarbonate	5,3	4,6	3,6	1,0
Surface ABS	5,2	4,2	4,0	0,2
Surface en polypropylène	5,1	4,1	4,1	0,0
Surface SEBS	5,0	4,1	3,9	0,2

D'après les résultats des essais présentés dans le tableau II, les quatre surfaces plastiques entraînent, après un temps de contact de 24 heures, une très faible réduction du nombre d'unités infectieuses de l'*Enterovirus type 1* ($0,0 \leq R \leq 1,0$).

Pour la surface en polycarbonate, la réduction du titre viral n'est pas nulle ($1,0 \log_{10}$) mais reste inférieure aux exigences des normes ($2 \log_{10}$).

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SARL au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT****VI : CONCLUSIONS :**

Selon les résultats obtenus, les surfaces plastiques en polycarbonate, ABS, polypropylène et SEBS ne présentent pas d'activité virucide conforme aux exigences des normes JIS Z 2801: 2000⁽¹⁾ et JIS Z 2801: 2006⁽²⁾ (réduction d'au moins 10² fois du nombre d'unités infectieuses déposées sur la surface test en 24 heures de contact à 36±1°C) quand le virus test est l'*Enterovirus type 1*.

Une activité non négligeable est cependant observée sur la surface en polycarbonate avec une réduction de 1.0 log du titre viral.

VII : REFERENCES :

1. JIS Z 2801: 2000 – Antimicrobial products: Test for antimicrobial activity and efficacy.
2. JIS Z 2801 : 2006 – Antimicrobial products : Test for antimicrobial activity and efficacy, Amendment 1
3. NF EN 14476 + A1: 2007 --.Antiseptiques et désinfectants chimiques - Essai virucide quantitatif de suspension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine - Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1).

Marlène RICHARD
Directrice adjointe du laboratoire

Signature

Date 14/11/2008

Lionel PINEAU
Directeur du laboratoire

Signature

Date 14/11/2008

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SARL au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

**HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT**

**EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE
DE SURFACES PLASTIQUES SELON UNE METHODOLOGIE BASEE
SUR LES NORMES
JIS Z 2801 : 2000 ET JIS Z 2801 : 2006**

Rapport rédigé par : Dr Marlène RICHARD

Marseille: 15 juin 2009

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

TABLE DES MATIERES

I :	DESCRIPTION DE L'ÉTUDE :	3
II :	OBJECTIF DE L'ETUDE :	3
III :	MATÉRIEL :	3
	a) Surfaces antimicrobiennes et surfaces témoins :	3
	b) Souches microbiennes :	4
	c) Milieu d'entretien et de dénombrement :	4
	d) Solution de récupération :	5
	e) Diluant :	5
IV :	MÉTHODE :	5
	a) Suspension d'essai :	5
	b) Contamination des surfaces à tester :	5
	c) Incubation des surfaces contaminées :	7
	d) Détermination du niveau de contamination des surfaces tests :	7
	e) Conditions d'essai :	7
	f) Expression de l'activité antimicrobienne :	8
V :	RÉSULTATS :	9
	a) Surfaces PC R903B:	9
	b) Surfaces ABS:	11
	c) Surfaces en polypropylène:	14
	d) Surfaces SEBS:	16
VI :	CONCLUSIONS :	18
VII :	RÉFÉRENCES :	18
VIII :	BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE:	18

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9

Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT****I : DESCRIPTION DE L'ETUDE:**

Intitulé:	Evaluation des activités antimicrobiennes de surfaces plastiques selon une méthodologie basée sur les normes JIS Z 2801: 2000 et JIS Z 2801: 2006.
Référence interne:	Etude n° 546.LEG.07
Commanditaire :	LEGRAND 128, av. du Maréchal de Lattre de Tassigny 87045 Limoges Cedex <i>Contact: Mr. HASBROUCK</i>
Période d'essai:	11/02/2008 au 28/11/2008.
Responsable étude :	Dr Marlène RICHARD
Essais réalisés par	Isabelle SEVEROVIC
Laboratoire d'essai :	Laboratoire BIOTECH-GERMANDE Parc Scientifique de Luminy 163 Avenue de Luminy – Case 927 13288 Marseille Cedex 9

II : OBJECTIF DE L'ETUDE :

Déterminer dans les conditions expérimentales décrites dans les normes JIS Z 2801: 2000⁽¹⁾ et JIS Z 2801: 2006⁽²⁾, la capacité de surfaces plastiques à réduire en 24 heures à 35±1°C, d'au moins 10² fois le nombre de microorganismes viables déposés sur la surface test.

III : MATERIEL :**a) Surfaces antimicrobiennes et surfaces témoins :**

Surfaces PC R903B
Surfaces ABS
Surfaces en polypropylène
Surfaces SEBS

Selon les conditions expérimentales décrites dans les normes JIS Z 2801: 2000⁽¹⁾ et JIS Z 2801: 2006⁽²⁾, 3 surfaces plastiques avec agent antimicrobien et 6 surfaces plastiques sans agent antimicrobien sont nécessaires à l'évaluation de l'activité antimicrobienne pour chaque microorganisme testé.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT****b) Souches microbiennes :****i) Surfaces PC R903B et ABS :**

L'activité antimicrobienne des surfaces plastiques PC R903B et ABS sont évaluées vis-à-vis des 9 souches microbiennes suivantes :

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	<i>Mycobacterium terrae</i> CIP 104321
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	<i>Mycobacterium avium</i> CIP 105415
<i>Escherichia coli</i> CIP 54127	Spores de <i>Bacillus cereus</i> CIP 105151
<i>Candida albicans</i> CIP 4872	Spores de <i>Bacillus subtilis</i> CIP 52.62
Spores d' <i>Aspergillus niger</i> CIP 1431.83	

ii) Surfaces en polypropylène et SEBS :

L'activité antimicrobienne des surfaces plastiques PC R903B et ABS sont évaluées vis-à-vis des 4 souches microbiennes suivantes :

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	<i>Escherichia coli</i> CIP 54127
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	<i>Mycobacterium terrae</i> CIP 104321

Les conditions de conservation et de contrôle des souches utilisées pour la détermination de l'activité bactéricide, mycobactéricide, sporicide et fongicide sont celles décrites dans la norme Française NF EN 12353 ⁽³⁾.

c) Milieu d'entretien et de dénombrement :

Pour *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83, *Escherichia coli* CIP 54127 les spores de *Bacillus subtilis* CIP 52.62 et les spores de *Bacillus cereus* CIP 105151 :

Gélose trypticase soja

Gélose TS (BIOMERIEUX, 51044).....	40 g
Eau distillée:.....	q.s.p. 1000 ml

Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes).

Pour *Mycobacterium terrae* CIP 104321 et *Mycobacterium avium* CIP 105415:

Gélose 7H10

Mycobacteria 7H10 agar (Difco A5062717).....	21 g
Glycerol (Sigma G5150).....	5 ml
Middle Brook OADC Enrichment (Difco A5701886).....	10% (v/v)
Eau distillée:.....	q.s.p. 1000 ml

Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes).

Pour *Candida albicans* CIP 4872 et les spores d'*Aspergillus niger* CIP 1431.83 :

Gélose à l'extrait de malt

Peptone de soja (SIGMA P-1265) :.....	3 g
Extrait de malt (SIGMA M0383) :.....	30g
Agar (SIGMA A5306) :.....	15g
Eau distillée:.....	q.s.p. 1 litre

Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes).

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT****d) Solution de récupération :**

Tween 80 (SIGMA P17-54) :	50 ml
Thiosulfate de sodium (SIGMA S85-03) :	10g
Saponine (SIGMA S79-00) :	5g
Lécithine (SIGMA P53-94) :	10g
Bouillon trypticase soja :	q.s.p.500 ml
Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes).	

e) Diluant :

Les suspensions d'essai sont préparées en tampon phosphate 100 mM, pH 7.0 (III.e.ii).

i) Solution stock :

<u>Tampon phosphate 10X (1000mM, pH 7.0) :</u>	
Phosphate de sodium dibasique, Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O :	144.5g
Phosphate de potassium monobasique, KH ₂ PO ₄ :	71.2g
Eau distillée:	q.s.p. 1 litre
Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes).	

ii) Solution de travail :

<u>Tampon phosphate 1X (100mM, pH 7.0) :</u>	
Tampon phosphate 10X (1000mM, pH 7.0) :	100 ml
Eau distillée:	q.s.p. 1 litre

IV : METHODE :**a) Suspension d'essai :**

Pour chaque microorganisme, la suspension d'essai du microorganisme test est préparée dans le diluant (cf. III.e). La suspension d'essai du microorganisme test est ajustée de façon à obtenir entre $2,5 \cdot 10^5$ et $10 \cdot 10^5$ UFC/ml, conformément aux recommandations de la norme JIS Z 2801: 2000⁽¹⁾. Le titre exact de chaque suspension d'essai (Tc) est vérifié à chaque essai par une méthode validée et spécifique à chaque microorganisme.

b) Contamination des surfaces à tester :

Pour chaque microorganisme, les surfaces tests, soit 3 surfaces plastiques avec agent antimicrobien et 6 surfaces plastiques sans antimicrobien, sont placées dans une boîte de Pétri, la face greffée exposée vers le haut. 400 µl de la suspension d'essai sont déposés sur chacune des surfaces puis recouverts par deux lamelles en verre (22 x 40 mm) de façon à répartir la suspension d'essai sur une surface de 1760 mm².

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy -- 163 Avenue de Luminy -- case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

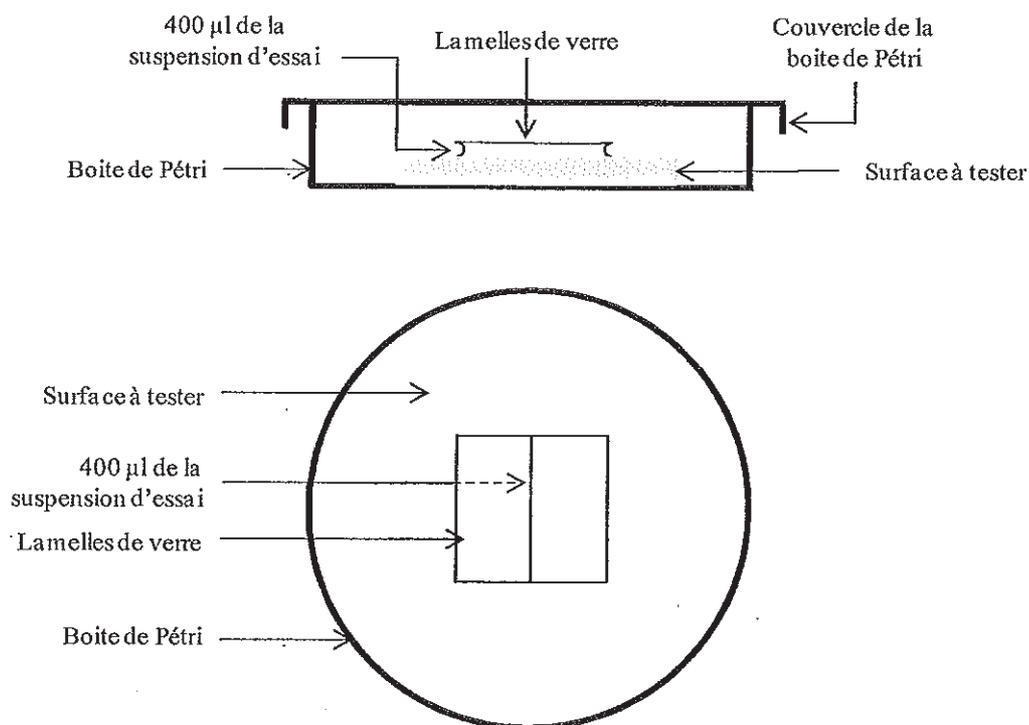
**BIOTECH - GERMANDE****HYGIÈNE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT**

Figure 1 : Contamination de la surface test par la suspension d'essai recouverte de lamelles en verre

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

c) Incubation des surfaces contaminées :

Après contamination, les 3 surfaces plastiques avec agent antimicrobien et 3 des six surfaces plastiques sans agent antimicrobien sont incubées à $35 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 ± 1 heures. Parallèlement, les 3 autres surfaces plastiques sans agent antimicrobien sont traitées immédiatement afin de déterminer le niveau de contamination initial des surfaces (cf: IV.d).

d) Détermination du niveau de contamination des surfaces tests :

Immédiatement après la contamination ou après incubation des surfaces plastiques, les microorganismes viables présents sur la surface sont dénombrés. Pour cela, dans un premier temps, les lamelles de verre sont précautionneusement retirées de la surface et transférées dans un tube contenant 10 ml de solution de récupération et environ 1 ml de billes de verre de 0,25 à 0,50 mm de diamètre. Les tubes contenant les lamelles de verre sont soumis à une agitation manuelle afin de décrocher les microorganismes. Dans un deuxième temps, la surface test est recouverte de 5 ml de solution de récupération puis est grattée à l'aide d'un grattoir à cellule et est rincée avec 5 ml supplémentaire de solution de récupération. Le volume de la solution de récupération contenant les microorganismes est recueilli dans la boîte de Pétri et transféré dans le tube contenant les lamelles de verre correspondantes. Le nombre de microorganismes viables présents par millilitre de milieu réactionnel est déterminé par dilutions successives au 1/10 et inclusion de 1ml de chaque dilution en milieu de dénombrement spécifique du microorganisme testé.

Après incubation à la température spécifique du microorganisme testé, les colonies apparues sont dénombrées et les résultats exprimés en nombre d'UFC présent par surface test.

e) Conditions d'essai :

Conformément aux exigences de la norme JIS Z 2801: 2000⁽¹⁾, les essais sont jugés satisfaisants si les conditions d'essai suivantes sont remplies :

- i) Valeur logarithmique du nombre de microorganismes viables sur la surface immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien :

$$(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{moyen}}) \leq 0,2$$

Avec L_{\max} : Logarithme maximum du nombre de microorganismes viables sur la surface;
 L_{\min} : Logarithme minimal du nombre de microorganismes viables sur la surface;
 L_{moyen} : Moyenne des logarithmes du nombre de microorganismes viables sur la surface pour les trois surfaces test sans agent antimicrobien.

- ii) Le nombre moyen de microorganismes viables immédiatement présents après la contamination des surfaces test sans agent antimicrobien doit être compris entre $1,0 \cdot 10^5$ (5,0 log) et $4,0 \cdot 10^5$ UFC/surface (5,6 log).
- iii) Le nombre de microorganismes viables sur chacune des surfaces test sans agent antimicrobien incubées 24 heures ne doit pas être inférieur à $1,0 \cdot 10^4$ UFC/surface (4 log).

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT****f) Expression de l'activité antimicrobienne :**

Lorsque les conditions d'essai sont validées, l'activité antimicrobienne des surfaces test est déterminée en utilisant la formule suivante :

$$R = [\log (B/A) - \log (C/A)] = [\log (B/C)]$$

Avec

R : La valeur de l'activité antimicrobienne ou facteur de réduction ;

A : Nombre moyen de microorganismes viables immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien ;

B : Nombre moyen de microorganismes viables après 24 heures d'incubation sur les surfaces sans agent antimicrobien ;

C : Nombre moyen de microorganismes viables après 24 heures d'incubation sur les surfaces avec agent antimicrobien.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

HYGIÈNE - FORMATION - ÉVALUATION
RECHERCHE & DÉVELOPPEMENT

V : RESULTATS :

a) Surfaces PC R903B:

i) Validation des conditions d'essai :

Tableau I: Validation des valeurs logarithmiques du nombre de microorganismes viables présents sur la surface immédiatement après contamination des surfaces PC R903B sans agent antimicrobien: $(L_{max} - L_{min})/(L_{moyen}) \leq 0,2$. L_{max} : logarithme maximum du nombre de microorganismes viables; L_{min} : logarithme minimal du nombre de microorganismes viables; L_{moyen} : moyenne des logarithmes du nombre de microorganismes viables pour les trois surfaces test sans agent antimicrobien.

	Essai 1 (L_{max})	Essai 2 (L_{min})	Essai 3	L_{moyen}	$(L_{max} - L_{min})/(L_{moyen})$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	5,62	5,52	5,53	5,56	0,02
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	5,49	5,23	5,26	5,34	0,05
<i>Escherichia coli</i> CIP 54127	5,30	4,45	5,26	5,00	0,17
<i>Mycobacterium terrae</i> CIP 104321	5,67	5,23	5,40	5,47	0,08
<i>Mycobacterium avium</i> CIP 105415	5,83	5,57	5,65	5,70	0,05
<i>Candida albicans</i> CIP 4872	5,84	5,16	5,40	5,56	0,12
Spores d' <i>Aspergillus niger</i> CIP 1431.83	5,18	5,00	5,18	5,12	0,03
Spores de <i>Bacillus cereus</i> CIP 105151	5,24	5,17	5,22	5,21	0,01
Spores de <i>Bacillus subtilis</i> CIP 52.62	5,32	5,26	5,26	5,28	0,01

Pour chaque microorganisme test :

- ✓ $(L_{max} - L_{min})/(L_{moyen})$ est inférieur à 0,2 (tableau I) ;
- ✓ Le nombre moyen de microorganismes viables immédiatement présents après la contamination des surfaces test PC R903B sans agent antimicrobien est compris entre $1,0 \cdot 10^5$ et $4,0 \cdot 10^5$ UFC/surface pour chacune des souches test à l'exception de *Mycobacterium avium* CIP 105415. Pour ce microorganisme, on observe un léger dépassement du niveau de contamination maximal souhaité ($5,0 \cdot 10^5$ UFC/surface au lieu de $4,0 \cdot 10^5$ UFC/surface) qui ne remet pas en cause la validité des conditions d'essais.

Les conditions d'essais sont donc considérées comme valides pour chaque microorganisme test.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE**HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

ii) Essais proprement dits

Tableau II : Evaluation de l'activité antimicrobienne des surfaces PC R903B vis-à-vis de chaque microorganisme test pour un temps de contact de 24 ± 1 heures à $35 \pm 1^\circ\text{C}$. A : nombre moyen de microorganismes viables sur la surface test immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien ; B : nombre moyen de microorganismes viables sur la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces sans agent antimicrobien ; C : nombre moyen de microorganismes viables sur la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces avec agent antimicrobien ; R : activité antimicrobienne.

	A (Nb. UFC/surface)	B (Nb. UFC/surface)	C (Nb. UFC/surface)	R [Log (B/C)]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	$3,6.10^5$	$1,0.10^7$	$4,0.10^2$	4,40
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	$2,2.10^5$	$2,4.10^7$	$5,0.10^4$	2,67
<i>Escherichia coli</i> CIP 54127	$1,4.10^5$	$3,3.10^7$	$< 1,4.10^1$	$> 6,37$
<i>Mycobacterium terrae</i> CIP 104321	$3,0.10^5$	$9,9.10^5$	$6,0.10^4$	1,21
<i>Mycobacterium avium</i> CIP 105415	$5,0.10^5$	$3,6.10^5$	$3,2.10^5$	0,04
<i>Candida albicans</i> CIP 4872	$3,6.10^5$	$6,2.10^5$	$8,5.10^4$	0,86
Spores d' <i>Aspergillus niger</i> CIP 1431.83	$1,3.10^5$	$1,1.10^5$	$1,4.10^5$	0,00
Spores de <i>Bacillus cereus</i> CIP 105151	$1,6.10^5$	$9,4.10^4$	$8,3.10^4$	0,05
Spores de <i>Bacillus subtilis</i> CIP 52.62	$1,9.10^5$	$1,5.10^5$	$1,3.10^5$	0,09

Pour chaque microorganisme test, le nombre moyen de microorganismes viables retrouvés sur la surface test sans agent antimicrobien après 24 heures d'incubation est supérieur à $1,0.10^4$ UFC/surface (tableau II, B). Les conditions d'essais sont donc considérées comme valides.

D'après les résultats des essais présentés dans le tableau II, l'activité antimicrobienne de la surface plastique PC R903B (cf. tableau II, C) entraîne une réduction d'au moins 10^2 fois du nombre de microorganismes viables lorsque les microorganismes tests sont : *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 et *Escherichia coli* CIP 54127. Pour ces trois souches, les réductions logarithmiques observées sont respectivement de $4,4 \log_{10}$, $2,7 \log_{10}$ et $> 6,4 \log_{10}$.

Pour *Mycobacterium terrae* CIP 104321 et *Candida albicans* CIP 4872, la réduction du nombre de microorganismes viables présents sur la surface test n'est pas nulle (respectivement $1,2 \log_{10}$ et $0,86 \log_{10}$) mais reste inférieure aux exigences des normes ($2 \log_{10}$).

Pour les autres microorganismes tests (*Mycobacterium avium* CIP 105415, spores d'*Aspergillus niger* CIP 1431.83, spores de *Bacillus cereus* CIP 105151 et spores de *Bacillus subtilis* CIP 52.62) les réductions du nombre de microorganismes viables liées à l'activité antimicrobienne de la surface sont nulles ou inférieures à $0,1 \log_{10}$.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Pare Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

b) Surfaces ABS:

i) Validation des conditions d'essais :

Tableau III : Validation des valeurs logarithmiques du nombre de microorganismes viables présents sur la surface immédiatement après contamination des surfaces ABS sans agent antimicrobien : $(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{moyen}}) \leq 0,2$. L_{\max} : logarithme maximum du nombre de microorganismes viables ; L_{\min} : logarithme minimal du nombre de microorganismes viables ; L_{moyen} : moyenne des logarithmes du nombre de microorganismes viables pour les trois surfaces test sans agent antimicrobien.

	Essai 1 (L_{\max})	Essai 2 (L_{\min})	Essai 3	L_{moyen}	$(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{moyen}})$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	5,24	5,22	5,24	5,23	0,01
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	5,64	5,44	5,61	5,56	0,03
<i>Escherichia coli</i> CIP 54127	5,52	5,21	5,30	5,34	0,06
<i>Mycobacterium terrae</i> CIP 104321	5,53	5,37	5,44	5,45	0,03
<i>Mycobacterium avium</i> CIP 105415	5,99	5,55	5,86	5,80	0,10
<i>Candida albicans</i> CIP 4872	4,86	4,84	4,84	4,85	0,01
Spores d' <i>Aspergillus niger</i> CIP 1431.83	4,83	4,73	4,81	4,79	0,02
Spores de <i>Bacillus cereus</i> CIP 105151	4,95	4,86	4,91	4,90	0,02
Spores de <i>Bacillus subtilis</i> CIP 52.62	4,81	4,72	4,74	4,76	0,02

Pour chaque microorganisme test :

- ✓ $(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{moyen}})$ est inférieur à 0,2 (tableau III) ;
- ✓ Le nombre moyen de microorganismes viables immédiatement présents après la contamination des surfaces test ABS sans agent antimicrobien est bien compris entre $5,0 \log_{10}$ ($1,0 \cdot 10^5$ UFC/surface) et $5,6 \log_{10}$ ($4,0 \cdot 10^5$ UFC/surface) pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83, *Escherichia coli* CIP 54127 et *Mycobacterium terrae* CIP 104321. Pour la souche de *Mycobacterium avium* CIP 105415, on observe un léger dépassement du niveau de contamination maximal souhaité ($6,9 \cdot 10^5$ UFC/surface au lieu de $4,0 \cdot 10^5$ UFC/surface). Pour les souches de *Candida albicans* CIP 4872, les spores d'*Aspergillus niger* CIP 1431.83, les spores de *Bacillus cereus* CIP 105151 et de *Bacillus subtilis* CIP 52.62, le nombre moyen de microorganismes viables immédiatement présents après la contamination des surfaces test sans agent antimicrobien est légèrement inférieur au niveau de contamination minimal souhaité ($5,7 \cdot 10^4$ UFC/surface pour *Bacillus subtilis* CIP 52.62 au lieu de $4,0 \cdot 10^5$ UFC/surface). Ces légers écarts aux exigences de la norme JIS Z 2801: 2000 ne remettent pas en cause la validité des conditions d'essais puisque pour chaque microorganisme test, le nombre moyen de microorganismes viables retrouvés sur la surface test sans agent antimicrobien après 24 heures d'incubation est supérieur à $1,0 \cdot 10^4$ UFC/surface (tableau IV, B).

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

Les conditions d'essais sont donc considérées comme valides pour chaque microorganisme test.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9

Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE**HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

ii) Tests proprement dits :

Tableau IV : Evaluation de l'activité antimicrobienne des surfaces ABS vis-à-vis de chaque microorganisme test pour un temps de contact de 24 ± 1 heures à $35 \pm 1^\circ\text{C}$. A : nombre moyen de microorganismes viables sur la surface test immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien ; B : nombre moyen de microorganismes viables sur la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces sans agent antimicrobien ; C : nombre moyen de microorganismes viables sur la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces avec agent antimicrobien ; R : activité antimicrobienne.

	A (Nb. UFC/surface)	B (Nb. UFC/surface)	C (Nb. UFC/surface)	R [Log (B/C)]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	$1,7 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^7$	< 14	> 5,88
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	$3,7 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^1$	4,02
<i>Escherichia coli</i> CIP 54127	$2,5 \cdot 10^5$	$8,5 \cdot 10^5$	< 14	> 4,80
<i>Mycobacterium terrae</i> CIP 104321	$2,8 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^5$	$8,7 \cdot 10^3$	1,45
<i>Mycobacterium avium</i> CIP 105415	$6,9 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^3$	1,61
<i>Candida albicans</i> CIP 4872	$7,0 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^5$	$8,2 \cdot 10^3$	1,11
Spores d' <i>Aspergillus niger</i> CIP 1431.83	$6,2 \cdot 10^4$	$9,0 \cdot 10^4$	$8,2 \cdot 10^4$	0,04
Spores de <i>Bacillus cereus</i> CIP 105151	$8,1 \cdot 10^4$	$5,1 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^4$	0,44
Spores de <i>Bacillus subtilis</i> CIP 52.62	$5,7 \cdot 10^4$	$4,7 \cdot 10^4$	$3,9 \cdot 10^4$	0,13

D'après les résultats des essais présentés dans le tableau IV, l'activité antimicrobienne de la surface plastique ABS (cf. tableau IV, C) entraîne une réduction d'au moins 10^2 fois du nombre de microorganismes viables lorsque les microorganismes tests sont : *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 et *Escherichia coli* CIP 54127. Pour ces trois souches, les réductions logarithmiques observées sont respectivement $>5,88 \log_{10}$, $4,02 \log_{10}$ et $> 4,80 \log_{10}$.

Pour *Mycobacterium terrae* CIP 104321, *Mycobacterium avium* CIP 105415 et *Candida albicans* CIP 4872, les réductions du nombre de microorganismes viables présents sur les surfaces tests ne sont pas nulles ($1,45 \log_{10}$, $1,61 \log_{10}$ et $1,11 \log_{10}$ respectivement) mais restent inférieures aux exigences des normes ($2 \log_{10}$).

Pour les autres microorganismes tests (spores d'*Aspergillus niger* CIP 1431.83, spores de *Bacillus cereus* CIP 105151 et spores de *Bacillus subtilis* CIP 52.62) les réductions du nombre de microorganismes viables liées à l'activité antimicrobienne de la surface ABS sont nulles ou inférieures à $0,5 \log_{10}$.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE**HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT**c) Surfaces en polypropylène:****i) Validation des conditions d'essais :**

Tableau V : Validation des valeurs logarithmiques du nombre de microorganismes viables présents sur la surface immédiatement après contamination des surfaces en polypropylène sans agent antimicrobien : $(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{moyen}}) \leq 0,2$.
 L_{\max} : logarithme maximum du nombre de microorganismes viables ; L_{\min} : logarithme minimal du nombre de microorganismes viables ; L_{moyen} : moyenne des logarithmes du nombre de microorganismes viables pour les trois surfaces tests sans agent antimicrobien.

	Essai 1 (L_{\max})	Essai 2 (L_{\min})	Essai 3	L_{moyen}	$(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{moyen}})$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	5,20	5,16	5,19	5,19	0,01
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	5,41	5,30	5,39	5,37	0,02
<i>Escherichia coli</i> CIP 54127	5,43	5,36	5,37	5,39	0,01
<i>Mycobacterium terrae</i> CIP 104321	5,07	4,69	4,99	4,92	0,08

Pour chaque microorganisme test :

- ✓ $(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{moyen}})$ est inférieur à 0,2 (tableau V) ;
- ✓ Le nombre moyen de microorganismes viables immédiatement présents après la contamination des surfaces tests en polypropylène sans agent antimicrobien est bien compris entre $5,0 \log_{10}$ ($1,0 \cdot 10^5$ UFC/surface) et $5,6 \log_{10}$ ($4,0 \cdot 10^5$ UFC/surface) pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 et *Escherichia coli* CIP 54127. Pour la souche de *Mycobacterium terrae* CIP 104321, le nombre moyen de microorganismes viables immédiatement présents après la contamination des surfaces tests sans agent antimicrobien est légèrement inférieur au niveau de contamination minimal souhaité ($8,8 \cdot 10^4$ UFC/surface au lieu de $1,0 \cdot 10^5$ UFC/surface). Ces légers écarts aux exigences de la norme JIS Z 2801: 2000 ne remettent pas en cause la validité des conditions d'essais puisque pour chaque microorganisme test, le nombre moyen de microorganismes viables retrouvés sur la surface test sans agent antimicrobien après 24 heures d'incubation est supérieur à $1,0 \cdot 10^4$ UFC/surface (tableau VI, B).

Les conditions d'essais sont donc considérées comme valides pour chaque microorganisme test.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9

Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

14/18

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIÈNE - FORMATION - ÉVALUATION
RECHERCHE & DÉVELOPPEMENT**

ii) Tests proprement dits :

Tableau VI : Evaluation de l'activité antimicrobienne des surfaces en polypropylène vis-à-vis de chaque microorganisme test pour un temps de contact de 24 ± 1 heures à $35 \pm 1^\circ\text{C}$. A : nombre moyen de microorganismes viables sur la surface test immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien ; B : nombre moyen de microorganismes viables sur la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces sans agent antimicrobien ; C : nombre moyen de microorganismes viables sur la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces avec agent antimicrobien ; R : activité antimicrobienne.

	A (Nb. UFC/surface)	B (Nb. UFC/surface)	C (Nb. UFC/surface)	R [Log (B/C)]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	$1,5 \times 10^5$	$2,1 \times 10^7$	$4,4 \times 10^5$	1,7
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	$2,3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$2,1 \times 10^3$	2,1
<i>Escherichia coli</i> CIP 54127	$2,5 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5$	$< 1,4 \times 10^2$	$> 3,7$
<i>Mycobacterium terrae</i> CIP 104321	$8,8 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$3,7 \times 10^2$	1,8

D'après les résultats des essais présentés dans le tableau VI, l'activité antimicrobienne de la surface plastique en polypropylène (cf. tableau VI, C) entraîne une réduction d'au moins 10^2 fois du nombre de microorganismes viables lorsque les microorganismes tests sont : *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 et *Escherichia coli* CIP 54127. Pour ces deux souches, les réductions logarithmiques observées sont respectivement de $2,1 \log_{10}$, et $> 3,7 \log_{10}$.

Pour *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467 et *Mycobacterium terrae* CIP 104321, les réductions du nombre de microorganismes viables présents sur les surfaces tests ne sont pas nulles ($1,7 \log_{10}$ et $1,8 \log_{10}$ respectivement) mais restent inférieures aux exigences des normes ($2 \log_{10}$).

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APÉ : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

d) Surfaces SEBS:

i) Validation des conditions d'essais :

Tableau VII : Validation des valeurs logarithmiques du nombre de microorganismes viables présents sur la surface immédiatement après contamination des surfaces SEBS sans agent antimicrobien : $(L_{\max} - L_{\min})/(L_{\text{moyen}}) \leq 0,2$. L_{\max} : logarithme maximum du nombre de microorganismes viables ; L_{\min} : logarithme minimal du nombre de microorganismes viables ; L_{moyen} : moyenne des logarithmes du nombre de microorganismes viables pour les trois surfaces test sans agent antimicrobien.

	Essai 1 (L_{\max})	Essai 2 (L_{\min})	Essai 3	L_{moyen}	$(L_{\max} - L_{\min})/(L_{\text{moyen}})$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	5,94	5,83	5,87	5,88	0,02
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	5,47	5,42	5,43	5,44	0,01
<i>Escherichia coli</i> CIP 54127	5,96	5,80	5,92	5,89	0,03
<i>Mycobacterium terrae</i> CIP 104321	5,39	5,29	5,35	5,34	0,02

Pour chaque microorganisme test :

- ✓ $(L_{\max} - L_{\min})/(L_{\text{moyen}})$ est inférieur à 0,2 (tableau VII) ;
- ✓ Le nombre moyen de microorganismes viables immédiatement présents après la contamination des surfaces tests SEBS sans agent antimicrobien est bien compris entre $5,0 \log_{10}$ ($1,0 \cdot 10^5$ UFC/surface) et $5,6 \log_{10}$ ($4,0 \cdot 10^5$ UFC/surface) pour les souches de *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 et *Mycobacterium terrae* CIP 104321. Pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467 et *Escherichia coli* CIP 54127, le nombre moyen de microorganismes viables immédiatement présents après la contamination des surfaces test sans agent antimicrobien est légèrement supérieur au niveau de contamination maximal souhaité ($7,7 \cdot 10^5$ UFC/surface soit $5,88 \log_{10}$ /surface pour *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467 et $7,9 \cdot 10^5$ UFC/surface soit $5,89 \log_{10}$ /surface pour *Escherichia coli* CIP 54127 au lieu de $4,0 \cdot 10^5$ UFC/surface). Ces légers écarts aux exigences de la norme JIS Z 2801: 2000 ne remettent pas en cause la validité des conditions d'essai.

Le nombre moyen de microorganismes viables retrouvés sur la surface test sans agent antimicrobien après 24 heures d'incubation est supérieur à $1,0 \cdot 10^4$ UFC/surface (tableau VIII, B) pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 et *Escherichia coli* CIP 54127. Les conditions d'essais sont donc considérées comme valides pour ces trois microorganismes. En revanche, le nombre moyen de microorganismes viables retrouvés sur la surface sans agent antimicrobien après 24 heures d'incubation est inférieur à $1,0 \cdot 10^4$ UFC/surface pour la souche de *Mycobacterium terrae* CIP 104321 ($7,2 \cdot 10^2$ UFC/surface). Les conditions ne peuvent donc pas être considérées comme valides pour ce microorganisme test.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9

Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE**HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

ii) Essais proprement dits :

Tableau VIII : Evaluation de l'activité antimicrobienne des surfaces SEBS vis-à-vis de chaque microorganisme test pour un temps de contact de 24 ± 1 heures à $35 \pm 1^\circ\text{C}$. A : nombre moyen de microorganismes viables sur la surface test immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien ; B : nombre moyen de microorganismes viables sur la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces sans agent antimicrobien ; C : nombre moyen de microorganismes viables sur la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces avec agent antimicrobien ; R : activité antimicrobienne.

	A (Nb. UFC/surface)	B (Nb. UFC/surface)	C (Nb. UFC/surface)	R [Log (B/C)]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	$7,7.10^5$	$1,1.10^7$	$1,1.10^7$	0,0
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	$2,8.10^5$	$2,1.10^5$	$8,6.10^4$	0,4
<i>Escherichia coli</i> CIP 54127	$7,9.10^5$	$7,6.10^5$	$< 1,4.10^1$	$> 4,6$
<i>Mycobacterium terrae</i> CIP 104321	$2,2.10^5$	$7,2.10^2$	$3,1.10^2$	0,9

D'après les résultats des essais présentés dans le tableau VIII, l'activité antimicrobienne de la surface plastique SEBS (cf. tableau VIII, C) entraîne une réduction d'au moins 10^2 fois du nombre de microorganismes viables lorsque le microorganisme test est *Escherichia coli* CIP 54127. Pour cette souche, la réduction logarithmique observée est $> 4,6 \log_{10}$.

Pour *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467 et *Staphylococcus aureus* CIP 4.83, les réductions du nombre de microorganismes viables présents sur les surfaces tests sont nulles.

Bien que les conditions d'essai ne soient pas validées pour *Mycobacterium terrae* CIP 104321, la réduction du nombre de microorganismes viables présents sur les surfaces tests n'est pas nulle ($0,9 \log_{10}$) mais reste inférieure aux exigences des normes ($2 \log_{10}$). La réduction observée ne peut être attribuée à l'agent antimicrobien.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

VI : CONCLUSIONS :

Selon les résultats obtenus dans les conditions de test définies, une activité antimicrobienne conforme aux exigences des normes JIS Z 2801: 2000⁽¹⁾ et JIS Z 2801: 2006⁽²⁾ (réduction d'au moins 10^2 fois du nombre de microorganismes viables déposés sur la surface test en 24 heures de contact à $35 \pm 1^\circ\text{C}$) est observée pour :

- les surfaces PC R903B et ABS lorsque les microorganismes tests sont *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 et *Escherichia coli* CIP 54127 ;
- les surfaces en polypropylène lorsque les microorganismes tests sont *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 et *Escherichia coli* CIP 54127 ;
- les surfaces SEBS lorsque le microorganisme test est *Escherichia coli* CIP 54127.

Bien qu'inférieures aux exigences des normes, une activité non négligeable est également observée pour :

- les surfaces PC R903B vis-à-vis de *Mycobacterium terrae* CIP 104321 (réduction de $1,21 \log_{10}$) et *Candida albicans* CIP 4872 (réduction de $0,86 \log_{10}$) ;
- pour les surfaces ABS vis-à-vis de *Mycobacterium terrae* CIP 104321 (réduction de $1,45 \log_{10}$), *Mycobacterium avium* CIP 105415 (réduction de $1,61 \log_{10}$) et *Candida albicans* CIP 4872 (réduction de $1,11 \log_{10}$) ;
- pour les surfaces en polypropylène vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467 (réduction de $1,7 \log_{10}$) et *Mycobacterium terrae* CIP 104321 (réduction de $1,8 \log_{10}$).

VII : REFERENCES :

1. JIS Z 2801: 2000 – Antimicrobial products: Test for antimicrobial activity and efficacy.
2. JIS Z 2801 : 2006 – Antimicrobial products : Test for antimicrobial activity and efficacy, Amendment 1
3. NF EN 12353: 2006 – Conservation des souches microbiennes utilisées pour la détermination de l'activité bactéricide, mycobactéricide, sporicide et fongicide.

VIII : BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE:

Cette étude a été réalisée conformément aux exigences générales de la norme NF EN ISO/CEN 17025 (2005) relative aux compétences des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

Le département Assurance Qualité a vérifié que ce rapport décrivait avec précision les procédures utilisées et que les résultats et conclusions présentés reflétaient les valeurs brutes de l'étude. Les procédures opérationnelles standards et les bonnes pratiques de laboratoire ont été suivies dans cette étude.

Les données originales de ce rapport, les cahiers de manipulation, les protocoles et le rapport d'étude final sont stockés dans les archives de Biotech-Germande sous la référence "546.LEG.07".

Christine AH-DIP
Responsable Assurance Qualité

Signature

Date 15/06/2009

Marlène RICHARD
Directrice adjointe du laboratoire

Signature

Date 15/06/2009

Lionel PINEAU
Directeur Général et Scientifique

Signature

Date 15/06/2009

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 122 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



815.LEG.09.1

BIOTECH - GERMANDE

**HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT**

**EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE
D'UNE SURFACE PLASTIQUE SELON UNE METHODOLOGIE
BASEE SUR LES NORMES
JIS Z 2801 : 2000 ET JIS Z 2801 : 2006**

Surfaces ABS marquées par tampographie

Rapport rédigé par : Dr Marlène RICHARD

Marseille: le 30 novembre 2009

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

1/11

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT****TABLE DES MATIERES**

I: DESCRIPTION DE L'ÉTUDE:	3
II: OBJECTIF DE L'ETUDE :	3
III: MATÉRIEL :	3
a) Surfaces antimicrobiennes :	3
b) Souches microbiennes :	4
c) Milieu d'entretien et de dénombrement :	4
d) Solution de récupération :	4
e) Diluant :	5
i) Solution stock	5
ii) Solution de travail	5
IV: MÉTHODE :	5
a) Suspension d'essai :	5
b) Contamination des surfaces à tester :	5
c) Incubation des surfaces contaminées :	7
d) Détermination du niveau de contamination des surfaces tests :	7
e) Conditions d'essai :	7
f) Expression de l'activité antimicrobienne :	8
V: RÉSULTATS :	9
a) Validation des conditions d'essai :	9
b) Essais proprement dits :	10
VI: CONCLUSIONS :	11
VII: RÉFÉRENCES :	11
VIII: BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE:	11

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9

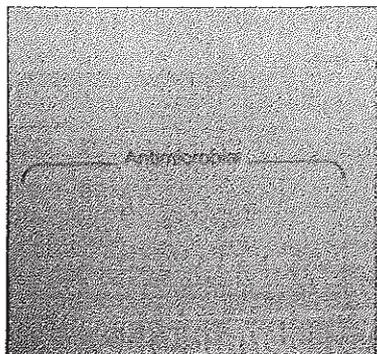
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT****I : DESCRIPTION DE L'ETUDE:**

Intitulé:	Evaluation des activités antimicrobiennes d'une surface plastique selon une méthodologie basée sur les normes JIS Z 2801: 2000 et JIS Z 2801: 2006. Surfaces ABS marquées par tampographie
Référence interne:	Etude n° 815.LEG.09
Commanditaire :	LEGRAND 128, av. du Maréchal de Lattre de Tassigny 87045 Limoges Cedex <i>Contact: Mme ARBOGAST</i>
Période d'essai:	02/11/2009 au 26/11/2009.
Responsable étude :	Dr Marlène RICHARD
Essais réalisés par :	Isabelle SEVEROVIC
Laboratoire d'essai :	Laboratoire BIOTECH-GERMANDE Parc Scientifique de Luminy 163 Avenue de Luminy – Case 927 13288 Marseille Cedex 9

II : OBJECTIF DE L'ETUDE :

Déterminer dans les conditions expérimentales décrites dans les normes JIS Z 2801: 2000⁽¹⁾ et JIS Z 2801: 2006⁽²⁾, la capacité de la surface plastique ABS marquée par tampographie à réduire en 24 heures à 35±1°C, d'au moins 10² fois le nombre de microorganismes viables déposés sur la surface test.

III : MATERIEL :**a) Surfaces antimicrobiennes :**

3 surfaces ABS marquées par tampographie avec agent antimicrobien et 6 surfaces ABS sans agent antimicrobien sont utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne de ces surfaces vis-à-vis de chaque souche microbienne.

Figure 1 : Surface plastique ABS marquée par tampographie

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)1 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT****b) Souches microbiennes :**

Pseudomonas aeruginosa CIP 103467
Staphylococcus aureus CIP 4.83
Candida albicans CIP 4872

Escherichia coli CIP 54127
Mycobacterium terrae CIP 104321

Les conditions de conservation et de contrôle des souches utilisées pour la détermination de l'activité bactéricide, mycobactéricide, sporicide et fongicide sont celles décrites dans la norme Française NF EN 12353 ⁽³⁾.

c) Milieu d'entretien et de dénombrement :

Pour *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 et *Escherichia coli* CIP 54127 :

Gélose trypticase soja

Gélose TS (BIOMERIEUX, 51044)40 g
Eau distillée:q.s.p. 1000 ml
Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes).

Pour *Mycobacterium terrae* CIP 104321:

Gélose 7H10

Mycobacteria 7H10 agar (Difco A5062717)21 g
Glycerol (Sigma G5150)5 ml
Middle Brook OADC Enrichment (Difco A5701886)10% (v/v)
Eau distillée:q.s.p. 1000 ml
Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes).

Pour *Candida albicans* CIP 4872 :

Gélose à l'extrait de malt

Peptone de soja (SIGMA P-1265) :3 g
Extrait de malt (SIGMA M0383) :30g
Agar (SIGMA A5306) :15g
Eau distillée:q.s.p. 1 litre
Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes).

d) Solution de récupération :

Tween 80 (SIGMA P17-54) :50 ml
Thiosulfate de sodium (SIGMA S85-03) :10g
Saponine (SIGMA S79-00) :5g
Lécithine (SIGMA P53-94) :10g
Bouillon trypticase soja :q.s.p. 500 ml
Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes).

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9

Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT****e) Diluant :****i) Solution stock**

Tampon phosphate 10X (1000mM, pH 7.0) :
Phosphate de sodium dibasique, Na₂HPO₄ 7H₂O :-----144.5g
Phosphate de potassium monobasique, KH₂PO₄:-----71.2g
Eau distillée: -----q.s.p. 1 litre
Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes).

ii) Solution de travail

Tampon phosphate 1X (100mM, pH 7.0) :
Tampon phosphate 10X (1000mM, pH 7.0) :-----100 ml
Eau distillée: -----q.s.p. 1 litre

IV : METHODE :

a) Suspension d'essai :

Pour chaque microorganisme, la suspension d'essai du microorganisme test est préparée dans le diluant (cf. III.e.ii). La suspension d'essai du microorganisme test est ajustée de façon à obtenir entre $2,5 \cdot 10^5$ et $10 \cdot 10^5$ UFC/ml, conformément aux recommandations de la norme JIS Z 2801: 2000⁽¹⁾. Le titre exact de chaque suspension d'essai (Tc) est vérifié à chaque essai par une méthode validée et spécifique à chaque microorganisme.

b) Contamination des surfaces à tester :

Chaque surface test, soit 3 surfaces ABS marquée par tampographie avec agent antimicrobien et 6 surfaces ABS sans antimicrobien, est placée dans une boîte de Pétri, la face greffée exposée vers le haut. 400 µl de la suspension d'essai sont déposés sur chacune des surfaces puis recouverts par deux lamelles en verre (22 x 40 mm) de façon à répartir la suspension d'essai sur une surface de 1760 mm².

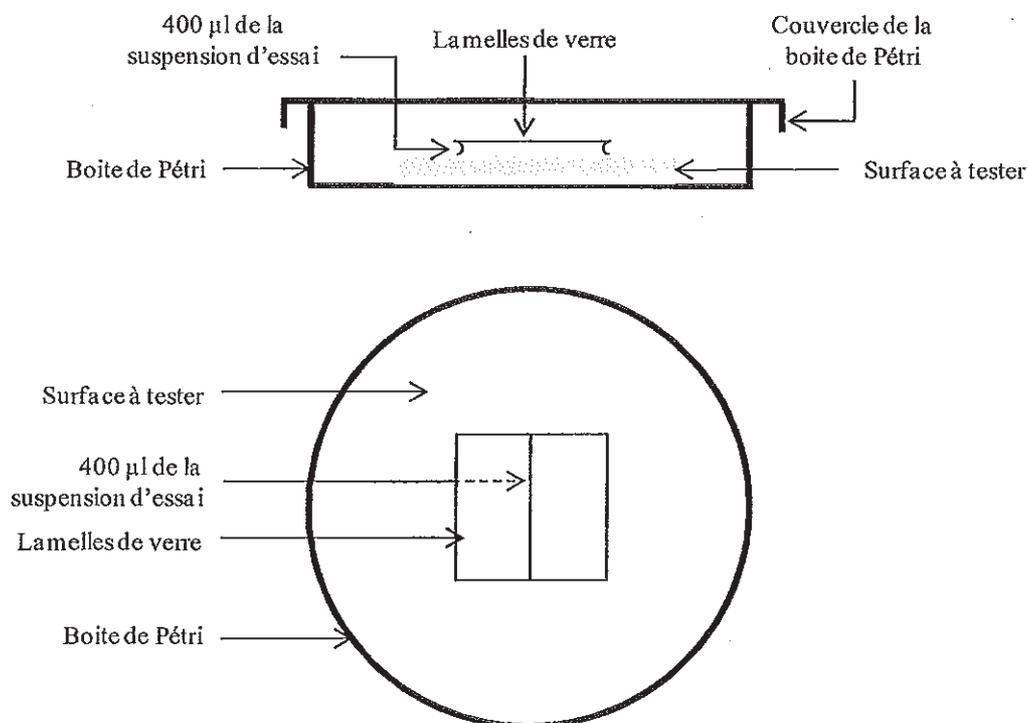
Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9

Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE**HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT**Figure 2 : Contamination de la surface test par la suspension d'essai recouverte de lamelles en verre**

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDESAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

c) Incubation des surfaces contaminées :

Après contamination, les 3 surfaces ABS marquées par tampographie avec agent antimicrobien et 3 des six surfaces ABS sans agent antimicrobien sont incubées à $35 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 ± 1 heures. Parallèlement, les 3 autres surfaces sans agent antimicrobien sont traitées immédiatement afin de déterminer le niveau de contamination initial des surfaces (cf : IV.d).

d) Détermination du niveau de contamination des surfaces tests :

Immédiatement après la contamination ou après incubation des surfaces, les microorganismes viables présents sur la surface sont dénombrés. Pour cela, dans un premier temps, les lamelles de verre sont précautionneusement retirées de la surface et transférées dans un tube contenant 10 ml de solution de récupération et environ 1 ml de billes de verre de 0,25 à 0,50 mm de diamètre. Les tubes contenant les lamelles de verre sont soumis à une agitation manuelle afin de décrocher les microorganismes. Dans un deuxième temps, la surface est recouverte de 5 ml de solution de récupération puis est grattée à l'aide d'un grattoir à cellule et est rincée avec 5 ml supplémentaire de solution de récupération. Le volume de la solution de récupération contenant les microorganismes est recueilli dans la boîte de Pétri et transféré dans le tube contenant les lamelles de verre correspondantes. Le nombre de microorganismes viables présents par millilitre de milieu réactionnel est déterminé par dilutions successives au 1/10 et inclusion de 1ml de chaque dilution en milieu de dénombrement spécifique du microorganisme testé. Après incubation à la température spécifique du microorganisme testé, les colonies apparues sont dénombrées et les résultats exprimés en nombre d'UFC présent par surface test.

e) Conditions d'essai :

Conformément aux exigences de la norme JIS Z 2801: 2000⁽¹⁾, les essais sont jugés satisfaisants si les conditions d'essai suivantes sont remplies :

- i) Valeur logarithmique du nombre de microorganismes viables sur la surface immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien :

$$(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{moyen}}) \leq 0,2$$

Avec L_{\max} : Logarithme maximum du nombre de microorganismes viables sur la surface;

L_{\min} : Logarithme minimal du nombre de microorganismes viables sur la surface;

L_{moyen} : Moyenne des logarithmes du nombre de microorganismes viables sur la surface pour les trois surfaces test sans agent antimicrobien.

- ii) Le nombre moyen de microorganismes viables immédiatement présents après la contamination des surfaces test sans agent antimicrobien doit être compris entre $1,0 \cdot 10^5$ ($5,0 \log_{10}$) et $4,0 \cdot 10^5$ UFC/surface ($5,6 \log_{10}$).
- iii) Le nombre de microorganismes viables sur chacune des surfaces test sans agent antimicrobien incubées 24 heures ne doit pas être inférieur à $1,0 \cdot 10^4$ UFC/surface ($4 \log_{10}$).

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9

Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

f) Expression de l'activité antimicrobienne :

Lorsque les conditions d'essai sont validées, l'activité antimicrobienne des surfaces test est déterminée en utilisant la formule suivante :

$$R = [\log (B/A) - \log (C/A)] = [\log (B/C)]$$

- Avec
- R: La valeur de l'activité antimicrobienne ou facteur de réduction ;
 - A: Nombre moyen de microorganismes viables immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien ;
 - B: Nombre moyen de microorganismes viables après 24 heures d'incubation sur les surfaces sans agent antimicrobien ;
 - C: Nombre moyen de microorganismes viables après 24 heures d'incubation sur les surfaces avec agent antimicrobien.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE**HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT**V : RESULTATS :****a) Validation des conditions d'essai :**

Tableau I : Validation des valeurs logarithmiques du nombre de microorganismes viables présents sur la surface immédiatement après contamination des surfaces ABS sans agent antimicrobien : $(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{moyen}}) \leq 0,2$. L_{\max} : logarithme maximum du nombre de microorganismes viables ; L_{\min} : logarithme minimal du nombre de microorganismes viables ; L_{moyen} : moyenne des logarithmes du nombre de microorganismes viables pour les trois surfaces test sans agent antimicrobien.

	Essai 1 (L_{\max})	Essai 2 (L_{\min})	Essai 3	L_{moyen}	$(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{moyen}})$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	5,03	4,91	5,00	4,98	0,025
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	4,93	4,88	4,92	4,91	0,001
<i>Escherichia coli</i> CIP 54127	6,07	6,01	6,04	6,04	0,009
<i>Mycobacterium terrae</i> CIP 104321	4,45	4,11	4,24	4,27	0,081
<i>Candida albicans</i> CIP 4872	6,04	5,81	5,93	5,93	0,040

Pour chaque microorganisme test :

- ✓ $(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{moyen}})$ est inférieur à 0,2 (tableau I) ;
- ✓ Le nombre moyen de microorganismes viables immédiatement présents après la contamination des surfaces test sans agent antimicrobien est bien compris entre $5,0 \log_{10}$ ($1,0 \cdot 10^5$ UFC/surface) et $5,6 \log_{10}$ ($4,0 \cdot 10^5$ UFC/surface) pour la souche de *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467. Pour les souches d'*Escherichia coli* CIP 54127 et de *Candida albicans* CIP 4872, on observe un dépassement du niveau de contamination maximal souhaité (respectivement $1,1 \cdot 10^6$ UFC/surface et $8,7 \cdot 10^5$ UFC/surface au lieu de $4,0 \cdot 10^5$ UFC/surface). Pour les souches de *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 et *Mycobacterium terrae* CIP 104321, le nombre moyen de microorganismes viables immédiatement présents après la contamination des surfaces test sans agent antimicrobien est légèrement inférieur au niveau de contamination minimal souhaité (respectivement $8,1 \cdot 10^4$ UFC/surface et $2,0 \cdot 10^4$ UFC/surface au lieu de $1,0 \cdot 10^5$ UFC/surface). Ces légers écarts aux exigences de la norme JIS Z 2801: 2000 ne remettent pas en cause la validité des conditions d'essais puisque pour chaque microorganisme test, le nombre moyen de microorganismes viables retrouvés sur la surface test sans agent antimicrobien après 24 heures d'incubation est supérieur à $1,0 \cdot 10^4$ UFC/surface (tableau II, B).

Les conditions d'essais sont donc considérées comme valides pour chaque microorganisme test.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9

Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE**HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT**b) Essais proprement dits :**

Tableau II : Evaluation de l'activité antimicrobienne des surfaces ABS marquées par tampographie vis-à-vis de chaque microorganisme test pour un temps de contact de 24 ± 1 heures à $35 \pm 1^\circ\text{C}$. A : nombre moyen de microorganismes viables sur la surface test immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien ; B : nombre moyen de microorganismes viables sur la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces sans agent antimicrobien ; C : nombre moyen de microorganismes viables sur la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces avec agent antimicrobien ; R : activité antimicrobienne.

	A (Nb. UFC/surface)	B (Nb. UFC/surface)	C (Nb. UFC/surface)	R [Log (B/C)]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	$9,6.10^4$	$4,7.10^6$	< 14	> 5,5
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	$8,1.10^4$	$1,8.10^4$	$2,1.10^1$	3,0
<i>Escherichia coli</i> CIP 54127	$1,1.10^6$	$7,2.10^5$	$3,0.10^2$	3,4
<i>Mycobacterium terrae</i> CIP 104321	$2,0.10^4$	$2,1.10^4$	< 14	> 3,2
<i>Candida albicans</i> CIP 4872	$8,7.10^5$	$6,8.10^5$	$1,9.10^5$	0,6

D'après les résultats des essais présentés dans le tableau II, l'activité antimicrobienne de la surface plastique ABS marquée par tampographie (cf. tableau II, C) entraîne une réduction d'au moins 10^2 fois du nombre de microorganismes viables lorsque les microorganismes tests sont : *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83, *Escherichia coli* CIP 54127 et *Mycobacterium terrae* CIP 104321. Pour ces quatre souches, les réductions logarithmiques observées sont respectivement de $>5,5 \log_{10}$, $3,0 \log_{10}$, $3,4 \log_{10}$ et $>3,2 \log_{10}$.

Pour *Candida albicans* CIP 4872, la réduction du nombre de microorganismes viables présents sur les surfaces tests n'est pas nulle ($0,6 \log_{10}$) mais reste inférieure aux exigences des normes ($2 \log_{10}$).

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9

Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT****VI : CONCLUSIONS :**

Les résultats obtenus démontrent que la surface plastique ABS marquée par tampographie entraîne une réduction d'au moins 10^2 fois le nombre de microorganismes viables déposés sur la surface test en 24 heures de contact à $35 \pm 1^\circ\text{C}$ quand les microorganismes tests sont *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83, *Escherichia coli* CIP 54127 et *Mycobacterium terrae* CIP 104321.

Une activité non négligeable est également observée sur *Candida albicans* CIP 4872 avec une réduction logarithmique de $0,6 \log_{10}$.

VII : REFERENCES :

1. JIS Z 2801: 2000 – Antimicrobial products: Test for antimicrobial activity and efficacy.
2. JIS Z 2801 : 2006 – Antimicrobial products : Test for antimicrobial activity and efficacy, Amendment 1
3. NF EN 12353: 2006 – Conservation des souches microbiennes utilisées pour la détermination de l'activité bactéricide, mycobactéricide, sporicide et fongicide.

VIII : BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE:

Cette étude a été réalisée conformément aux exigences générales de la norme NF EN ISO/CEI 17025 (2005) relative aux compétences des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

Le département Assurance Qualité a vérifié que ce rapport décrivait avec précision les procédures utilisées et que les résultats et conclusions présentés reflétaient les valeurs brutes de l'étude. Les procédures opérationnelles standards et les bonnes pratiques de laboratoire ont été suivies dans cette étude.

Les données originales de ce rapport, les cahiers de manipulation, les protocoles et le rapport d'étude final sont stockés dans les archives de Biotech-Germande sous la référence "815.LEG.09".

Christine AH-DIP
Responsable Assurance Qualité

Signature

Date 30/11/2009

Marlène RICHARD
Directrice adjointe du laboratoire

Signature

Date 30/11/2009

Lionel PINEAU
Directeur du laboratoire

Signature

Date 30/11/2009

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

11/11



BIOTECH - GERMANDE

**HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT**

**EVALUATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE
D'UNE SURFACE PLASTIQUE SELON UNE METHODOLOGIE
BASEE SUR LES NORMES
JIS Z 2801 : 2000 ET JIS Z 2801 : 2006**

Surfaces ABS marquées par tampographie

Rapport rédigé par : Dr Marlène RICHARD

Marseille: le 30 novembre 2009

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9

Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

TABLE DES MATIERES

I :	DESCRIPTION DE L'ÉTUDE :	3
II :	OBJECTIF DE L'ÉTUDE :	3
III :	MATÉRIEL :	3
a)	Surfaces antimicrobiennes et surfaces témoins :	3
b)	Souches d'essai :	4
c)	Culture cellulaire :	4
d)	Difuant, milieu de culture et solution de récupération :	4
IV :	MÉTHODE :	4
a)	Suspension d'essai :	4
b)	Contamination des surfaces à tester :	4
c)	Incubation des surfaces contaminées :	4
d)	Détermination du niveau de contamination des surfaces tests :	4
e)	Conditions d'essai :	5
f)	Expression de l'activité virucide :	5
V :	RÉSULTATS :	6
a)	Validation des conditions d'essai :	6
b)	Essais proprement dits :	6
VI :	CONCLUSIONS :	7
VII :	RÉFÉRENCES :	7

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9

Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

I : DESCRIPTION DE L'ETUDE:

Intitulé:	Evaluation de l'activité virucide d'une surface plastique selon une méthodologie basée sur les normes JIS Z 2801: 2000 et JIS Z 2801: 2006. Surfaces ABS marquées par tampographie
Référence interne:	Etude n° 815.LEG.09
Commanditaire :	LEGRAND 128, av. du Maréchal de Lattre de Tassigny 87045 Limoges Cedex <i>Contact: Mr. HASBROUCK</i>
Période d'essai:	06/11/2009 au 23/11/2009.
Responsable étude :	Dr Marlène RICHARD
Laboratoire d'essai :	Laboratoire FONDEREPHAR Laboratoire de bactériologie, virologie et Microbiologie Industrielle

II : OBJECTIF DE L'ETUDE :

Déterminer dans les conditions expérimentales décrites dans les normes JIS Z 2801: 2000⁽¹⁾ et JIS Z 2801: 2006⁽²⁾, la capacité de la surface plastique ABS marquée par tampographie à réduire en 24 heures à $35 \pm 1^\circ\text{C}$, d'au moins 10^2 fois le nombre d'unités infectieuses de l'*Enterovirus type 1* et de l'*Influenza virus A (H1N1)*.

III : MATERIEL :

a) Surfaces antimicrobiennes et surfaces témoins :

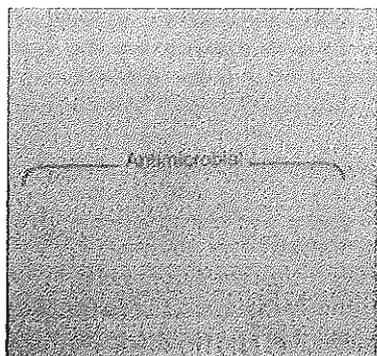


Figure 1 : Surface plastique ABS marquée par tampographie

3 surfaces ABS marquées par tampographie avec agent antimicrobien et 6 surfaces ABS sans agent antimicrobien sont utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne de ces surfaces vis-à-vis de chaque virus.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT****b) Souches d'essai :**

Enterovirus type 1 :AFSSAPS lot n° NIBSC 01/528
Influenza virus A (H1N1) :ATCC (VR-1520) lot n°7534335

c) Culture cellulaire :

Cellules VEROATCC CLL-81, batch n° 3372621
Cellules MDCKATCC CLL-34, batch n° 58078519

Les conditions de conservation et de contrôle de la souche utilisée pour la détermination de l'activité virucide est celle décrite dans la norme Française NF EN 14476 + A1 : 2007.

d) Diluant, milieu de culture et solution de récupération :

EMEM à 2% de sérum de veau fœtal (SVF).

IV : METHODE :

a) Suspension d'essai :

Le titre de la suspension virale est ajustée entre 5,4 log DICT₅₀ et 6,0 log DICT₅₀ dans du milieu de culture EMEM à 2% de SVF.

b) Contamination des surfaces à tester :

Pour chaque nature de surface test, 3 surfaces avec agent antimicrobien et 6 surfaces sans antimicrobien, sont placées dans une boîte de Pétri, la face greffée exposée vers le haut. 480 µl du film viral sont déposés sur chacune des surfaces puis recouverts par une lame de verre de 50 x 50 mm.

c) Incubation des surfaces contaminées :

Après contamination, les 3 surfaces plastiques ABS marquées par tampographie avec agent antimicrobien et 3 des six surfaces sans agent antimicrobien sont incubées à 36 ± 1°C pendant 24 ± 1 heures. Parallèlement, les 3 autres surfaces sans agent antimicrobien sont traitées immédiatement afin de déterminer le niveau de contamination initial des surfaces.

d) Détermination du niveau de contamination des surfaces tests :

Immédiatement après la contamination ou après incubation des surfaces, le titrage des virus viables résiduels présents sur la surface est effectué. Pour cela, le film viral est récupéré par addition de 10 ml d'une solution neutralisante (milieu de culture EMEM + 2% SVF) par grattage doux à l'aide d'un grattoir pour cellules.

La technique de titrage est celle indiquée dans la norme NF EN 14476 + A1 : 2007. Des dilutions de raison 4 des suspensions virales sont réalisées dans le milieu de culture cellulaire EMEM en tubes de verre neutre afin de limiter les phénomènes d'adsorption des virus sur les surfaces.

Le titrage est effectué sur microplaques de 96 puits.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT**

L'effet cytopathique est déterminé après 48 heures de culture et l'estimation du nombre d'unités infectieuses est déterminée par la méthode de SPAERMAN-KARBER en calculant le logarithme négatif du point limite 50% (log DICT₅₀) par la formule suivante :

Log DICT₅₀ = Logarithme négatif de la plus haute concentration de virus utilisée - [(Somme de % affecté à chaque dilution/100 - 0,5) X (log de dilution)].

e) Conditions d'essai :

Conformément aux exigences de la norme JIS Z 2801: 2000⁽¹⁾, les essais sont jugés satisfaisants si les conditions d'essai suivantes sont remplies :

i) Titre viral sur la surface immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien :

$$(T_{\max} - T_{\min}) / (T_{\text{moyen}}) \leq 0,2$$

Avec T_{\max} : Titre viral maximum sur la surface;

T_{\min} : Titre viral minimal sur la surface;

T_{moyen} : Titre viral moyen sur la surface pour les trois surfaces test sans agent antimicrobien.

ii) Le titre viral moyen immédiatement présents après la contamination des surfaces test sans agent antimicrobien doit être compris entre $1,0 \cdot 10^5$ ($5,0 \log_{10}$) et $4,0 \cdot 10^5$ unité infectieuse/surface ($5,6 \log_{10}$).

iii) Le titre viral sur chacune des surfaces test sans agent antimicrobien incubées 24 heures ne doit pas être inférieur à $1,0 \cdot 10^4$ unité infectieuse/surface ($4 \log_{10}$).

f) Expression de l'activité virucide :

Lorsque les conditions d'essai sont validées, l'activité virucide des surfaces test est déterminée en utilisant la formule suivante :

$$R = [\log (B/A) - \log (C/A)] = [\log (B/C)]$$

Avec R : La valeur de l'activité virucide ou facteur de réduction ;

A : Nombre moyen de doses infectantes virales 50% (DICT₅₀) immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien ;

B : Nombre moyen de doses infectantes virales 50% (DICT₅₀) après 24 heures d'incubation sur les surfaces sans agent antimicrobien ;

C : Nombre moyen de doses infectantes virales 50% (DICT₅₀) après 24 heures d'incubation sur les surfaces avec agent antimicrobien.

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9

Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

V : RESULTATS :

a) Validation des conditions d'essai :

Tableau I : Validation des titres viraux présents sur la surface immédiatement après contamination des surfaces plastiques ABS sans agent antimicrobien : $(T_{\max} - T_{\min}) / (T_{\text{moyen}}) \leq 0,2$. T_{\max} : titre viral maximum ; T_{\min} : titre viral minimal ; T_{moyen} : moyenne des titres viraux pour les trois surfaces test sans agent antimicrobien.

	Essai 1 (T_{\max})	Essai 2 (T_{\min})	Essai 3	T_{moyen}	$(T_{\max} - T_{\min}) / (T_{\text{moyen}})$
<i>Enterovirus type I</i>	5,5	5,3	5,5	5,4	0,04
<i>Influenza virus A (H1N1)</i>	5,2	5,1	5,1	5,1	0,02

Pour chaque microorganisme test :

- ✓ $(T_{\max} - T_{\min}) / (T_{\text{moyen}})$ est inférieur à 0,2 (tableau I) ;
- ✓ Les charges virales moyennes immédiatement présentes après la contamination des surfaces test sans agent antimicrobien sont bien comprises entre $5,0 \log_{10}$ ($1,0 \cdot 10^5$ UI/surface) et $5,6 \log_{10}$ ($4,0 \cdot 10^5$ UI/surface) d'*Enterovirus type I* et d'*Influenza virus A (H1N1)*.

Les conditions d'essais sont donc considérées comme valides pour chaque type de surface soumis à l'essai.

b) Essais proprement dits :

Tableau II : Evaluation de l'activité virucide de la surface plastique ABS marquée par tampographie vis-à-vis de l'*Enterovirus type I* et de l'*Influenza virus A (H1N1)* pour un temps de contact de 24 ± 1 heures à $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Log A : Log DICT₅₀ sur la surface test immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien ; log B : Log DICT₅₀ sur la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces sans agent antimicrobien ; log C : Log DICT₅₀ sur la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces avec agent antimicrobien ; R : activité virucide.

	Log A	Log B	Log C	R [Log B - Log C]
<i>Enterovirus type I</i>	5,4	5,3	5,1	0,2
<i>Influenza virus A (H1N1)</i>	5,1	4,3	2,2	2,1

D'après les résultats des essais présentés dans le tableau II, la surface plastique ABS marquée par tampographie entraînent, après un temps de contact de 24 heures, une réduction d'au moins 10^2 fois du nombre d'unités infectieuses de l'*Influenza virus A (H1N1)*.

Pour l'*Enterovirus type I*, la réduction du titre viral est pratiquement nulle ($0,2 \log_{10}$) et est inférieure aux exigences des normes ($2 \log_{10}$).

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy - 163 Avenue de Luminy - case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE**HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT**VI : CONCLUSIONS :**

Les résultats obtenus démontrent que la surface plastique ABS marquée par tampographie présente une d'activité virucide conforme aux exigences des normes JIS Z 2801: 2000⁽¹⁾ et JIS Z 2801: 2006⁽²⁾ (réduction d'au moins 10² fois du nombre d'unités infectieuses déposées sur la surface test en 24 heures de contact à 36±1°C) quand le virus test est l'*Influenza virus A* (H1N1).

Une activité quasi négligeable est cependant observée vis-à-vis de l'*Enterovirus type I* avec une réduction de seulement 0.2 log du titre viral.

VII : REFERENCES :

1. JIS Z 2801: 2000 – Antimicrobial products: Test for antimicrobial activity and efficacy.
2. JIS Z 2801 : 2006 – Antimicrobial products : Test for antimicrobial activity and efficacy, Amendment 1
3. NF EN 14476 + A1: 2007 – Antiseptiques et désinfectants chimiques - Essai virucide quantitatif de suspension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine - Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1).

Marlène RICHARD
Directrice adjointe du laboratoire

Signature

Date 30/11/2009

Lionel PINEAU
Directeur du laboratoire

Signature

Date 30/11/2009

Le présent rapport ne doit pas être reproduit, sinon dans son intégralité, sans l'autorisation écrite de Biotech Germande

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 505 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

Référence	ABS	PC	PP	SEBS
67740	X			
67741	X			
67742	X			
67743	X			
67744		X		
67745	X			
67746	X			
67747	X			
67748	X			
67749	X			
67750	X			
67760		X		
69001	X	X		
69002	X	X		
69003	X	X		
70711	X		X	
70712	X		X	
70721	X		X	
70722	X		X	
70724			X	
70725			X	
70726	X		X	
70727	X		X	
70730	X		X	
70732	X	X	X	
70733	X	X	X	
70741	X		X	X
70742	X		X	X
70743	X		X	X
70749	X		X	X
70761	X		X	X
70771	X		X	X
70772	X		X	X
70773	X		X	X
70782	X	X	X	X
70783	X	X	X	X
70788	X		X	X
70792	X		X	X
70793	X		X	X
70794	X		X	X
76581		X		
76582		X		
76583		X		
76584		X		
76666	X	X		
76685	X	X		
77027	X			
77043	X	X		
77080	X			
77112		X		
77115		X		
77116		X		
77117		X		
77118		X		
77126		X		
77131	X	X		
77132	X	X		
77133		X		
77141		X		
77146		X		
77147		X		
77150		X		

Référence	ABS	PC	PP	SEBS
77198	X	X		
77216		X		
77217		X		
77219		X		
77220		X		
77231	X	X		
78240	X			X
78242	X			X
78244	X			X
78248	X	X	X	
78249	X	X	X	X
78329		X		
78330		X		
78332	X	X		
78335	X	X		
78336	X	X		
78375	X			
78376	X			
78700	X			
78701		X		
78702		X		
78703	X	X		
78704		X		
78705	X			
78706		X		
78707		X		
78709		X		
78710	X			
78711	X			
78712	X	X		
78713		X		
78714	X			
78715	X			
78716	X	X		
78720	X			
78721	X			
78722	X	X		
78723	X	X		
78724	X	X		
78725	X	X		
78726	X	X		
78880	X			X
99629	X	X		
99639	X			
674420		X		
678023		X		
678024	X		X	X
678025		X		
678026		X		
678117	X			
678126		X		
678129		X		
678130		X		
678145	X			
678201	X			
678203	X			
678206	X			
678221	X			
678222	X			
678224	X			