



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE DU PRODUIT " BS 33 " (HBA) SELON LA NORME NF EN 13727⁽¹⁾

(20°C - 60 MINUTES - CONDITIONS DE SALETE)

Rapport rédigé par : Virginie Charbonnier

Marseille le : 21/04/2009

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'ETUDE :	3
II :	OBJECTIF DE L'ETUDE :	3
III :	MATERIEL :	3
a)	Identification de l'échantillon :	3
IV :	METHODE D'ESSAI ET SA VALIDATION :	4
a)	Souche-test:	4
b)	Méthode utilisée : Dilution-neutralisation	4
c)	Neutralisant	4
d)	Milieu d'entretien et de dénombrement :	4
V :	CONDITIONS EXPERIMENTALES :	5
a)	Diluant du produit :	5
b)	Substances interférentes pour conditions de saleté :	5
VI :	RESULTATS :	6
a)	Détermination de l'activité bactéricide en conditions de saleté :	6
VII :	CONCLUSIONS :	8
VIII :	REFERENCES :	8
IX :	BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE:	8

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 : Détermination de l'activité bactéricide du produit "BS 33" (HBA) selon la norme NF EN 13727⁽¹⁾ (20°C – 60 minutes – conditions de saleté)

Code interne : Etude N° : 591.HBA.08

Commanditaire : HBA SA
Recherche et développement
Allée des Dauphins
38330 SAINT-ISMIER
Contact : Mr Wijsenbeek

Période de l'étude : du 19/08/08 au 21/08/08

Responsable de l'étude : Dr Lionel Pineau (Microbiologiste – Directeur Général et Scientifique)

Réalisation des essais : Delphine Avon

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 la norme NF EN 13727⁽¹⁾ la capacité du produit "BS 33" (HBA) à réduire, en présence de substances interférentes de référence (conditions de saleté) en 60 minutes de contact à 20°C, d'au moins 10⁵ fois le nombre de cellules viables lorsque les souches-test sont des cellules végétatives de *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 et *Enterococcus hirae* CIP 5855.

III : MATERIEL :

a) Identification de l'échantillon :

Nom du produit : BS 33 (HBA)
Numéros de lot : Non communiqué
Dates de péremption : Non communiqué
Réceptionné le : 18/07/08
Code interne : 591.HBA.08.1254
Fabricant : HBA
Conditions de stockage : Stocké à température ambiante
Substances actives : Non communiqué

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**IV : METHODE D'ESSAI ET SA VALIDATION :****a) Souche-test:**

Pseudomonas aeruginosa CIP 103467
Staphylococcus aureus CIP 4.83
Enterococcus hirae CIP 5855

Les conditions de conservation et de contrôle des souches bactériennes utilisées pour la détermination de l'activité bactéricide sont celles décrites dans la norme Européenne NF EN 12353 ⁽²⁾ (Protocole interne : PROT.Souche.001).

b) Méthode utilisée : -----Dilution-neutralisation**c) Neutralisant**

Tween 80 (SIGMA P17-54):-----50 ml
Thiosulfate de sodium (SIGMA S85-03): -----10 g
Saponine (SIGMA S79-00): -----5 g
Lécithine (ACROS 413102500): -----10 g
L-Histidine (SIGMA H-8000): -----5 g
Bouillon trypticase soja (BIOMERIEUX 51019) : -----15 g
Eau distillée-----q.s.p.500 ml

Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes)
N° de lot interne : B691.2.2

d) Milieu d'entretien et de dénombrement :

Gélose Trypticase soja (BIOMERIEUX 51044)

Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes)
Code interne : B693.1.2

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**V : CONDITIONS EXPERIMENTALES :**

Concentrations du produit soumises à l'essai :

- ✓ C₁ : BS 33 (HBA) à 26,67% (v/v)
- ✓ C₂ : BS 33 (HBA) à 53,33% (v/v)
- ✓ C₃ : BS 33 (HBA) à 80,00% (v/v)

Température d'essai : 20°C ± 1°C
Temps de contact : 60 minutes ± 10 sec
Diluant du produit :
 Recommandé par le fabricant Eau
 Lors des essais Eau distillée
Température d'incubation : 37°C ± 1°C
Aspect du produit soumis à l'essai : marron

a) Diluant du produit :

Eau distillée stérile : N° de lot interne : B691.1.2

b) Substances interférentes pour conditions de saleté :**i) Préparation de la solution albumine bovine 3% (p/v) :**

Albumine bovine (US BIOLOGICAL, A1310-05): 3,0 g
Tryptone-sel (BIOMERIEUX, 42076): 97 ml
Stérilisé par filtration.

ii) Préparation des érythrocytes de mouton :

Centrifuger au moins 8 ml de sang de mouton défibriné (OXOID, SR0051C) à 800 g pendant 10 minutes. Eliminer le surnageant et resuspendre les érythrocytes dans le bouillon Tryptone-sel (BIOMERIEUX, 42076). Répéter cette opération au moins trois fois jusqu'à obtention d'un surnageant incolore.

iii) Préparation du mélange albumine / érythrocytes :

Resuspendre 3 ml d'érythrocytes avec 97 ml de solution d'albumine bovine à 3% (p/v).

Avec ce mélange, les concentrations finales en érythrocytes et en albumine bovine seront respectivement de 3 ml/l et 3 g/l.

N° de lot interne : SI.Slt.210808

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 : RESULTATS :****a) Détermination de l'activité bactéricide en conditions de saleté :****i) Essais préliminaires :**Méthode par dilution - neutralisation

Souche-test	Nombre de cellules viables (UFC/ml)						
	Suspension bactérienne d'essai		Suspension de validation		Témoin de neutralisation (B)	Validation de la méthode (C)	Témoin des conditions expérimentales (A)
	N	N ₀	N _v	N _{v0}			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	3,4.10 ⁸	3,4.10 ⁷	7,9.10 ²	7,9.10 ¹	8,0.10 ¹	1,0.10 ²	7,4.10 ¹
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	4,9.10 ⁸	4,9.10 ⁷	8,4.10 ²	8,4.10 ¹	8,8.10 ¹	7,5.10 ¹	8,5.10 ¹
<i>Enterococcus hirae</i> CIP 5855	4,7.10 ⁸	4,7.10 ⁷	1,1.10 ³	1,1.10 ²	1,1.10 ²	1,0.10 ²	1,0.10 ²

Tableau I : Vérification de la méthodologie et validation de la méthode par dilution-neutralisation pour la concentration d'essai de 80,00% (v/v) du produit soumis à l'essai.

Pour les 3 souches soumises à l'essai :

N est compris entre 1,5.10⁸ UFC/ml et 5,0.10⁸ UFC/ml.

N₀ est compris entre 1,5.10⁷ UFC/ml et 5,0.10⁷ UFC/ml.

N_v est compris entre 3,0.10² et 1,6.10³ UFC/ml

N_{v0} est compris entre 3,0.10¹ et 1,6.10² UFC/ml.

A, B et C sont supérieurs ou égaux à 0,5 x N_{v0}

Le quotient des dénombrements moyens pondérés est compris entre 5 minimum et 15 maximum.

La neutralisation par dilution-neutralisation est donc validée pour la dilution d'essai de 80,00% (v/v) et pour les 3 souches soumises à l'essai.

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 :

Souche-test	Temps de contact	Nombre de cellules viables (UFC/ml) pour le mélange d'essai (Na) pour les concentrations :		
		C1 26,67% (v/v)	C2 53,33% (v/v)	C3 80,00% (v/v)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	60 min	> 3,3.10 ³	< 1,4.10 ²	< 1,4.10 ²
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	60 min	> 3,3.10 ³	< 1,6.10 ²	< 1,4.10 ²
<i>Enterococcus hirae</i> CIP 5855	60 min	< 1,4.10 ²	< 1,4.10 ²	< 1,4.10 ²

Tableau II : Nombre de cellules viables pour le mélange d'essai, après un temps de contact de 60 minutes à 20°C, avec le produit "BS 33" (HBA) aux différentes concentrations testées et en présence de substances interférentes de référence (pour conditions de saleté).

Souche-test	Temps de contact	Réduction (lgR= lgNo - lgNa) du nombre de cellules viables pour les concentrations :		
		C1 26,67% (v/v)	C2 53,33% (v/v)	C3 80,00% (v/v)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	60 min	< 4,0	> 5,4	> 5,4
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 4.83	60 min	< 4,2	> 5,5	> 5,6
<i>Enterococcus hirae</i> CIP 5855	60 min	> 5,5	> 5,5	> 5,5

Tableau III : Réduction du nombre de cellules viables, après un temps de contact de 60 minutes à 20°C, avec le produit "BS 33" (HBA) en présence de substances interférentes de référence (pour conditions de saleté).

Remarque : Aucune formation de précipité durant la réalisation de l'essai (les mélanges d'essai se sont montrés homogènes).

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

VII : CONCLUSIONS :

Conformément à la **NF EN 13727⁽¹⁾**, le produit « **BS 33** » (HBA ; code interne 591.HBA.08.1254), lorsqu'il est dilué dans de l'eau distillée à **53,33 % (v/v)**, présente une **activité bactéricide en 60 minutes à 20°C** dans des **conditions de saleté** (3 ml/l d'érythrocytes de mouton et 3 g/l d'albumine bovine), vis-à-vis des souches de référence *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 et *Enterococcus hirae* CIP 5855.

La réduction obtenue avec la souche d'essai limitante *Pseudomonas aeruginosa* est inférieure à 4,0 lg. Toutes les autres souches d'essai ont présenté une sensibilité supérieure à celle de *Pseudomonas aeruginosa*.

Remarque : Pour déclarer, ou non, la conformité, l'incertitude associée au résultat n'a pas été prise en compte.

VIII : REFERENCES :

- 1 - NF EN 13727 : Juillet 2004, Antiseptiques et désinfectants chimiques- Essais quantitatifs de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide des désinfectants chimiques pour les instruments utilisés en médecine- Méthode d'essai et prescriptions (phase 2/étape1).
- 2 - NF EN 12353 : Septembre 2006, Conservation des souches microbiennes utilisées pour la détermination de l'activité bactéricide, mycobactéricide, sporicide et fongicide.

IX : 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 "591.HBA.08".

Virginie CHARBONNIER Signature
Suppléant Responsable essai

Date 21/04/2009

Christine AH-DIP Signature
Responsable Assurance Qualité

Date 21/04/2009

Lionel PINEAU Signature
Directeur Général et Scientifique

Date 21/04/2009

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