ALKAZYME®

Detergente desinfectante enzimático alcalino

Para a limpieza y la desinfección
por inmersión
de los dispositivos medicales
invasivos y no invasivos

Dilución 0,5%

Expediente técnica

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

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD

(Reglamento REACH (CE) n° 1907/2006 - n° 2015/830)

SECCIÓN 1 : IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O LA MEZCLA Y DE LA SOCIEDAD O LA EMPRESA

1.1. Identificador del producto

Nombre del producto : ALKAZYME

Código del producto : FS CLP1092

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

Detergente desinfectante enzymatico alcalino para la limpieza y la desinfección por immersión.

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

Denominación Social : SODEL - Gamme ALKAPHARM.

Dirección : 190 Rue René Barthélémy - Pôle d'activités de l'Espérance.14100.LISIEUX.FRANCE.

Teléfono : +33 (0)2 31 31 10 50. Fax : +33 (0)2 31 31 80 60.

www.sodel-sa.eu / www.alkapharm.fr

1.4. Teléfono de emergencia : +33 (0)1 45 42 59 59.

Sociedad/Organismo : INRS / ORFILA http://www.centres-antipoison.net.

SECCIÓN 2 : IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

2.1. Clasificación de la sustancia o de la mezcla

En conformidad con el reglamento (CE) n° 1272/2008 y sus adaptaciones.

Irritación cutánea, Categoría 2 (Skin Irrit. 2, H315).

Lesiones oculares graves, Categoría 1 (Eye Dam. 1, H318).

Peligroso para el medio ambiente acuático - Peligro crónico, Categoría 3 (Aquatic Chronic 3, H412).

Esta mezcla no presenta peligro físico. Consulte las recomendaciones acerca de los demás productos presentes en el lugar.

2.2. Elementos de la etiqueta

La mezcla es un producto detergente (ver sección 15).

La mezcla es un producto detergente desinfectante para el dispositivos médicos.

En conformidad con el reglamento (CE) n° 1272/2008 y sus adaptaciones.

Pictogramas de peligro :

GHS05

Palabra de advertencia :

PELIGRO

Identificadores del producto :

CAS 26183-52-8	ALCOHOL ETOXILADO C10
EC 230-525-2	CLORURO DE DIDECILDIMETILAMONIO

Indicaciones de peligro :

H315	Provoca irritación cutánea.
H318	Provoca lesiones oculares graves.
H412	Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Consejos de prudencia - Carácter general :

P102	Mantener fuera del alcance de los niños.

Consejos de prudencia - Prevención :

P273	Evitar su liberación al medio ambiente.
P280	Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

Consejos de prudencia - Respuesta :

P302 + P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.
P305 + P351 + P338	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

- Made under licence of European Label System® MSDS software from InfoDyne - http://www.infodyne.fr -

P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGlA o un médico.

Consejos de prudencia - Eliminación :

P501 Eliminar el contenido/el recipiente como un residuo peligroso.

2.3. Otros peligros

Durante el uso, posible formación de mezcla polvo-aire inflamable/explosiva.

La mezcla no contiene “Sustancias extremadamente preocupantes » (SVHC) >= 0,1% publicadas por el Organismo Europeo de Productos Químicos (ECHA) según el artículo 57 del REACH : http://echa.europa.eu/fr/candidate-list-table

La mezcla no responde a los criterios aplicables a las mezclas PBT ni vPvB en conformidad con el anexo XIII de la reglamentación REACH (CE) n° 1907/2006.

SECCIÓN 3 : COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

3.2. Mezclas

Composición :

Identificación	(CE) 1272/2008	Nota	%
INDEX: 011-005-00-2 CAS: 497-19-8 EC: 207-838-8 REACH: 01-2119485498-19 CARBONATO DE SODIO	GHS07 Wng Eye Irrit. 2, H319		25 <= x % < 50
CAS: 68439-49-6 ALCOHOL ETOXILADO C16-C18	GHS07 Wng Eye Irrit. 2, H319		2.5 <= x % < 10
CAS: 26183-52-8 ALCOHOL ETOXILADO C10	GHS07, GHS05 Dgr Acute Tox. 4, H302 Eye Dam. 1, H318		2.5 <= x % < 10
CAS: 7173-51-5 EC: 230-525-2 CLORURO DE DIDECILDIMETILAMONIO	GHS07, GHS05, GHS09 Dgr Acute Tox. 4, H302 Skin Corr. 1B, H314 Eye Dam. 1, H318 Aquatic Chronic 2, H411 Aquatic Acute 1, H400 M Acute = 10		2.5 <= x % < 10
INDEX: 603-117-00-0 CAS: 67-63-0 EC: 200-661-7 REACH: 01-2119457558-25 PROPAN-2-OL	GHS02, GHS07 Dgr Flam. Liq. 2, H225 Eye Irrit. 2, H319 STOT SE 3, H336	[1]	0 <= x % < 2.5

(Texto completo de las frases H: ver la sección 16)

Información sobre los componentes :

[1] Sustancia para la cual existen valores límites de exposición en el lugar de trabajo.

SECCIÓN 4 : PRIMEROS AUXILIOS

De forma general, en caso de duda o si persisten los síntomas, llamar siempre a un médico

NO hacer ingerir NUNCA nada a una persona inconsciente.

4.1. Descripción de los primeros auxilios

En caso de proyecciones o de contacto con los ojos :

Lavar abundantemente con agua dulce y limpia durante 15 minutos, manteniendo los párpados separados

Sea cual fuera el estado inicial, enviar sistemáticamente el sujeto a un oftalmólogo mostrándole la etiqueta

Si aparece un dolor, rojeces o una molestia visual, consultar a un oftalmólogo

En caso de proyecciones o de contacto con la piel :

Retirar las ropas impregnadas y lavar cuidadosamente la piel con agua y jabón o utilizar un producto de limpieza conocido

Tener cuidado con el producto que puede quedar entre la piel y la ropa, el reloj, los zapatos, etc.

Cuando la zona contaminada es amplia y/o aparecen lesiones cutáneas, es necesario consultar a un médico o trasladar al paciente a un medio hospitalario.

- Made under licence of European Label System® MSDS software from InfoDyne - http://www.infodyne.fr -

En caso de ingestión :

No hacerle absorber nada por la boca

En caso de ingestión, si la cantidad es poco importante (no más de un trago), enjuagar la boca con agua y consultar a un médico

Mantener en reposo. No inducir el vómito.

Recurrir inmediatamente a un médico y mostrarle la etiqueta.

En caso de ingestión accidental, consultar a un médico si es necesario realizar un control y un posterior tratamiento en medio hospitalario, de ser necesario. Mostrarle la etiqueta.

4.2. Principales síntomas y efectos, agudos y retardados

No hay datos disponibles.

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

No hay datos disponibles.

SECCIÓN 5 : MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS

No inflamable.

5.1. Medios de extinción

Medios de extinción apropiados

En caso de incendio, utilizar :

- agua pulverizada o niebla de agua
- espuma
- polvos polivalentes ABC
- polvos BC
- dióxido de carbono (CO2)

Polvo químico, dióxido de carbono y otros gases son adecuados para la extinción de pequeños incendios.

Medios de extinción inapropiados

En caso de incendio, no utilizar :

- chorro de agua

5.2. Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla

Un incendio produce frecuentemente un espeso humo negro. La exposición a los productos de descomposición puede conllevar riesgos para la salud

No respirar los humos

En caso de incendio, se puede formar :

- monóxido de carbono (CO)
- dióxido de carbono (CO2)

5.3. Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios

El personal de intervención deberá estar equipado de aparatos de protección respiratoria autónomos aislantes

SECCIÓN 6 : MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

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

Remitirse a las medidas de protección enumeradas en las rúbricas 7 y 8

Para el personal de no primeros auxilios

Evitar cualquier contacto con la piel y los ojos

Para el personal de primeros auxilios

El personal de intervención contará con equipos de protección individual apropiado (Consultar la sección 8).

6.2. Precauciones relativas al medio ambiente

Contener y recoger las fugas con materiales absorbentes no combustibles, como por ejemplo : arena, tierra, vernicular, tierra de diatomeas en bidones para la eliminación de los residuos

Impedir el vertido en alcantarillas o cursos de agua.

6.3. Métodos y material de contención y de limpieza

Recuperar el producto por medios mecánicos (barrido/aspiradora) : no generar polvo.

6.4. Referencia a otras secciones

No hay datos disponibles.

- Made under licence of European Label System® MSDS software from InfoDyne - http://www.infodyne.fr -

SECCIÓN 7 : MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Las prescripciones relativas a los lugares de almacenamiento se aplican a las zonas de trabajo donde se manipula la mezcla.

7.1. Precauciones para una manipulación segura

Lavarse las manos después de cada utilización.

Quitarse y lavar la ropa contaminada antes de volver a utilizarla.

Instalar duchas de seguridad y fuentes de lavado de ojos en las zonas de trabajo donde se manipula la mezcla constatemente.

Prevención de incendios :

Manipular en zonas bien ventiladas

Prohibir el acceso a las personas no autorizadas

Equipos y procedimientos recomendados :

Para la protección individual, consultar la sección 8.

Observar las precauciones indicadas en la etiqueta, así como las normativas de la protección de seguridad y prevención de riegos laborales.

Evitar imperativamente el contacto de la mezcla con los ojos.

Los embalajes abiertos deben cerrarse cuidadosamente y conservarse en posición vertical

Equipos y procedimientos prohibidos :

Está prohibido fumar, comer y beber en los lugares donde se utiliza la mezcla.

7.2. Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades

No hay datos disponibles.

Almacenamiento

Manténgase fuera del alcance de los niños.

Conservar el recipiente bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado.

Almacenar a una temperatura entre 5°C y 35°C.

Embalaje

Conservar siempre en embalaje original.

7.3. Usos específicos finales

No hay datos disponibles.

SECCIÓN 8 : CONTROLES DE EXPOSICIÓN/PROTECCIÓN INDIVIDUAL

8.1. Parámetros de control

Valores límite de exposición profesional :

- España (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), 2017) :

CAS	TWA :	STEL :	Techo :	Definitión :	Criterios :
67-63-0	200 ppm 500 mg/m³	400 ppm 1000 mg/m³		VLB®, s	

8.2. Controles de la exposición

Usado en la dosis de uso, el producto no está clasificado y no requiere el uso de equipo de protección personal.

Medidas de protección individual, tales como los equipos de protección individual

Utilizar equipos de protección individual limpios y en buen estado.

Almacenar los equipos de protección individual en un lugar limpio, lejos de la zona de trabajo.

Durante la utilización, no comer, beber ni fumar. Quitarse y lavar la ropa contaminada antes de volver a utilizarla. Proporcionar una ventilación adecuada, sobre todo en los lugares cerrados.

- Protección de ojos / rostro

Evitar el contacto con los ojos

Antes de cualquier manipulación de polvos o emisión de polvos, es necesario usar gafas máscara conformes a la norma EN166.

El uso de gafas correctoras no constituye una protección.

Implementar fuentes de lavado de ojos en los talleres donde el producto se manipula de forma constante.

- Protección de las manos

Utilizar guantes protectores apropiados resistentes a los agentes químicos y conformes a la norma EN374.

La selección de los guantes se debe realizar según la aplicación y la duración del uso en el puesto de trabajo.

Los guantes protectores se deben escoger según el puesto de trabajo : si se pueden manipular otros productos químicos, si es necesario protección física (cortes, pinchazos, protección térmica), destreza requierida.

Tipo de guantes recomendados :

- Caucho nitrilo (Copolímero butadieno-acrilonitrilo (NBR))

- Made under licence of European Label System® MSDS software from InfoDyne - http://www.infodyne.fr -

Características recomendadas :

- Guantes impermeables conformes a la norma EN374

- Protección corporal

Evitar el contacto con la piel.

Utilizar ropa de protección apropiada

Esta ropa se seleccionará con objeto de evitar la inflamación e irritación de la piel del cuello y de las muñecas por contacto con el polvo

Tipo de vestimenta de protección apropiada :

Usar ropa de protección química contra los productos químicos sólidos, partículas en suspensión en el aire (tipo 5) conforme a la norma EN13982-1 para evitar cualquier contacto con la piel.

La ropa del personal debe lavarse con regularidad.

Después del contacto con el producto, habrá que lavar todas las partes del cuerpo que se hayan contaminado.

- Protección respiratoria

Evitar la inhalación de los polvos.

Tipo de máscara FFP :

Usar una media-máscara que filtre los polvos de uso único en conformidad con la norma EN149.

SECCIÓN 9 : PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

9.1. Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

Información general

Estado Físico :	Polvo
Olor :	Almendra
Color :	Polvo blanco

Información importante en relación con la salud, la seguridad y el medio ambiente :

pH :	No concernido.
Punto/intervalo de ebullición :	No concernido.
Intervalo de Punto de inflamación :	No concernido.
Presión de vapor (50°C) :	No concernido.
Densidad :	0.72 +/- 0.03 g/mL
Solubilidad en agua :	Soluble.
Punto/intervalo de fusión :	No concernido.
Temperatura de autoinflamación :	No concernido.
Punto/intervalo de de descomposición :	No concernido.

9.2. Otros datos

pH a 0.5% en solución acuosa :	11.2 +/- 0.5 (agua desmineralizada)
pH a 0.5% en solución acuosa :	10.3 +/- 0.5 (agua dura)

SECCIÓN 10 : ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

10.1. Reactividad

No hay datos disponibles.

10.2. Estabilidad química

Esta mezcla es estable en las condiciones de manipulación y de almacenamiento recomendadas en la sección 7.

10.3. Posibilidad de reacciones peligrosas

Expuesta a temperaturas elevadas, la mezcla puede emanar productos de descomposición peligrosos, tales como monóxido y dióxido de carbono, humos, óxido de nitrógeno.

10.4. Condiciones que deben evitarse

Evitar :

- la formación de polvos

Los polvos pueden formar una mezcla explosiva con el aire.

- Manejar las dosis solubles en agua con las manos mojadas.

10.5. Materiales incompatibles

Aluminio

10.6. Productos de descomposición peligrosos

La descomposición térmica puede provocar/formar :

- monóxido de carbono (CO)
- dióxido de carbono (CO2)

- Made under licence of European Label System® MSDS software from InfoDyne - http://www.infodyne.fr -

SECCIÓN 11 : INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

11.1. Información sobre los efectos toxicológicos

Puede ocasionar lesiones cutáneas reversibles, tales como una inflamación de la piel o la formación de eritemas y de escaras o edemas, como consecuencia de una exposición de hasta cuatro horas.

Puede ocasionar efectos irreversibles en los ojos, tales como lesiones de los tejidos oculares o una degradación grave de la visión que no es totalmente reversible al cabo de un período de observación de 21 días.

Las lesiones oculares graves se caracterizan por la destrucción de la córnea, una opacidad persistente de la córnea, una inflamación del iris.

11.1.1. Sustancias

Toxicidad aguda :

CLORURO DE DIDECILDIMETILAMONIO (CAS: 7173-51-5)

Por vía oral :	DL50 = 329 mg/kg Especie : rata OECD Guideline 401 (Acute Oral Toxicity)
Por vía cutánea :	DL50 > 1000 mg/kg Especie : conejo

Corrosión cutánea/irritación cutánea:

CLORURO DE DIDECILDIMETILAMONIO (CAS: 7173-51-5)

Corrosividad :	Provoca graves quemaduras en la piel. OECD Guideline 404 (Acute Dermal Irritation / Corrosion) Efecto observado : Overall irritation score Especie : conejo OECD Guideline 404 (Acute Dermal Irritation / Corrosion)

Sensibilización respiratoria o cutánea :

CLORURO DE DIDECILDIMETILAMONIO (CAS: 7173-51-5)

Test de Buehler :	No sensibilizante. Especie : Conejillo de Indias Other guideline

Mutagenicidad en las células germinales :

CLORURO DE DIDECILDIMETILAMONIO (CAS: 7173-51-5)

Mutagénesis (in vivo) :	Negativo. Especie : rata OECD Guideline 475 (Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test)
Mutagénesis (in vitro) :	Negativo. Especie : bacterias OECD Guideline 471 (Bacterial Reverse Mutation Assay)
Test de Ames (in vitro) :	Negativo.

11.1.2. Mezcla

Toxicidad aguda :

Producto en solución al 0,5% : Según la Línea Directa 401 de la OCDE, LD0 > 40 000 mg / kg - No es peligroso en caso de ingestión accidental.

Producto puro : Según la Directriz 401 de la OCDE, la preparación no es peligrosa si se ingiere accidentalmente - DL0 > 2000 mg / kg.

Según la Directriz 403 de la OCDE, no se observa toxicidad aguda por inhalación durante un período de exposición de 4 horas : CL50 > 0,065 mg / L.

Corrosión cutánea/irritación cutánea :

Producto en solución al 0,5% : Según la Directriz 404 de la OCDE, la solución al 0,5% en agua destilada no irrita la piel.

Lesiones oculares graves/irritación ocular :

Producto en una solución al 0,5% : De acuerdo con la Directriz 405 de la OCDE, la preparación de la solución al 0,5% en agua destilada no es irritante para el ojo.

- Made under licence of European Label System® MSDS software from InfoDyne - http://www.infodyne.fr -

Sensibilización respiratoria o cutánea :

Contiene al menos una sustancia sensibilizante. Puede provocar una reacción alérgica.

Producto en una solución al 0,5%: Preparación para el contacto con la piel no sensibilizante de acuerdo con la Línea Directa 406 de la OCDE (evaluación del potencial de sensibilización de la piel en cobayas).

Monografía(s) del CIRC (Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer) :

CAS 67-63-0 : IARC Grupo 3 : El agente no es clasificable por su potencial carcinogénico para los seres humanos.

SECCIÓN 12 : INFORMACIÓN ECOLÓGICA

Nocivo para los organismos acuáticos, ocasiona efectos a largo plazo.

Deberá evitarse toda circulación del producto en alcantarillas o cursos de agua

12.1. Toxicidad

12.1.1. Sustancias

ALCOHOL ETOXILADO C10 (CAS: 26183-52-8)

Toxicidad para los crustáceos :	CE50 = 15 mg/l Especie : Daphnia sp. Duración de exposición : 48 h OECD Guideline 202 (Daphnia sp. Acute Immobilisation Test)
Toxicidad para las algas :	CEr50 = 19.6 mg/l Duración de exposición : 72 h OECD Guideline 201 (Alga, Growth Inhibition Test)

CLORURO DE DIDECILDIMETILAMONIO (CAS: 7173-51-5)

Toxicidad para los peces :	CL50 = 0.5 mg/l Factor M = 1 Especie : Brachydanio rerio Duración de exposición : 96 h
Toxicidad para los crustáceos :	CE50 = 0.03 mg/l Especie : Daphnia magna Duración de exposición : 48 h NOEC = 0.021 mg/l Especie : Daphnia magna Duración de exposición : 21 days OECD Guideline 211 (Daphnia magna Reproduction Test)
Toxicidad para las algas :	CEr50 = 0.06 mg/l Especie : Selenastrum capricornutum Duración de exposición : 96 h

12.1.2. Mezclas

Toxicidad para los peces :	Ningún efecto observado. 10 < LC50 <= 100 mg/l Especie : Danio rerio Duración de exposición : 96 h OECD Guideline 203 (Fish, Acute Toxicity Test) EC50 = 2.9 mg/l Duración de exposición : 48 h ISO 6341 15 (Water quality - Determination of the Inhibition of the Mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)) ECr50 = 39.6 mg/l Duración de exposición : 72 h ISO 8692 (Water Quality - Fresh Water Algal Growth Inhibition Test with Scenedesmus subspicatus and Selenastrum capricornutum) EC10 = 6.4 mg/l

- Made under licence of European Label System® MSDS software from InfoDyne - http://www.infodyne.fr -

Duración de exposición : 72 h
ISO 8692 (Water Quality - Fresh Water Algal Growth Inhibition Test with Scenedesmus subspicatus and Selenastrum capricornutum)

12.2. Persistencia y degradabilidad

Tensioactivos en esta preparación cumplan con las normas de biodegradabilidad, tal como se definen en el Reglamento (CE) n ° 648/2004 sobre detergentes.

Los datos para justificar esta afirmación están a disposición de las autoridades competentes de los Estados miembros y se pondrá a disposición a petición suya, bien a petición de un fabricante de detergentes.

12.2.1. Sustancias

CLORURO DE DIDECILDIMETILAMONIO (CAS: 7173-51-5)
Biodegradación : Se degrada rápidamente.

ALCOHOL ETOXILADO C10 (CAS: 26183-52-8)
Biodegradación : no hay datos disponibles sobre la degradabilidad. La sustancia se considera como que no se degrada rápidamente.

12.2.2. Mezclas

Este producto es totalmente biodegradable según los criterios de la OCDE 302B : biodegradación superior al 70% en 28 días (94%).

12.3. Potencial de bioacumulación

No hay datos disponibles.

12.4. Movilidad en el suelo

No hay datos disponibles.

12.5. Resultados de la valoración PBT y mPmB

No hay datos disponibles.

12.6. Otros efectos adversos

No hay datos disponibles.

SECCIÓN 13 : CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN

Se debe realizar una gestión apropiada de los residuos de la mezcla y/o de su envase en conformidad con las disposiciones de la directiva 2008/98/CE.

13.1. Métodos para el tratamiento de residuos

No verter en las alcantarillas ni en los cursos de agua

Residuos :

La gestión de los residuos se realiza sin poner en peligro la salud humana y sin perjudicar el medioambiente, y en especial, sin crear riesgos para el agua, el aire, el suelo, la fauna o la flora.

Reciclarlos o eliminarlos según la legislación en vigor, de preferencia por un gestor de residuos o una empresa autorizada.

No contaminar el suelo o el agua con los residuos, y no eliminarlos en el medio ambiente.

Envases contaminados :

Vaciar completamente el envase. Conservar la(las) etiqueta(s) en el envase.

Entregar a un gestor autorizado.

SECCIÓN 14 : INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE

Preparación exenta de la clasificación y del etiquetado Transporte

14.1. Número ONU

-

14.2. Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas

-

14.3. Clase(s) de peligro para el transporte

-

14.4. Grupo de embalaje

-

14.5. Peligros para el medio ambiente

-

- Made under licence of European Label System® MSDS software from InfoDyne - http://www.infodyne.fr -

14.6. Precauciones particulares para los usuarios

-

SECCIÓN 15 : INFORMACIÓN REGLAMENTARIA

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

-Información relativa a la clasificación y al etiquetado que figura en la sección 2:

Se han tenido en cuenta las siguientes reglamentaciones:

Reglamento (CE) n° 1272/2008 modificado por la normativa (UE) n° 2018/669 (ATP 11)

-Información relativa al embalaje:

No hay datos disponibles.

- Disposiciones particulares :

No hay datos disponibles.

- Etiquetado de los detergentes (Reglamento CE n° 648/2004,907/2006) :

- igual o superior al 30 % : fosfatos
- igual o superior al 5 % pero inferior al 15 % : tensioactivos catiónicos
- igual o superior al 5 % pero inferior al 15 % : tensioactivos no iónicos
- enzimas
- desinfectantes.
- perfumes

15.2. Evaluación de la seguridad química

No hay datos disponibles.

SECCIÓN 16 : OTRA INFORMACIÓN

Dado que no conocemos las condiciones de trabajo del usuario, las informaciones que figuran en la presente ficha de seguridad se basarán en el estado de nuestros conocimientos y en las normativas tanto nacionales como comunitarias.

La mezcla no debe ser utilizada para otros usos que no sean los especificados en la sección 1 sin haber obtenido previamente instrucciones de manipulación por escrito.

El usuario es totalmente responsable de tomar todas las medidas necesarias para responder a las exigencias de las leyes y normativas locales.

La información indicada en la presente ficha de datos de seguridad debe considerarse como una descripción de las exigencias de seguridad relativas a esta mezcla y no como una garantía de las propiedades de la misma.

Version PRO.

Texto de las frases mencionadas en la sección 3 :

H225	Líquido y vapores muy inflamables.
H302	Nocivo en caso de ingestión.
H314	Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
H318	Provoca lesiones oculares graves.
H319	Provoca irritación ocular grave.
H336	Puede provocar somnolencia o vértigo.
H400	Muy tóxico para los organismos acuáticos.
H411	Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Abreviaturas :

WGK : Wassergefahrdungsklasse (Clase de peligro para el agua).

GHS05 : Corrosión

PBT : Persistente, bioacumulable y tóxico.

vPvB : Muy persistente y muy bioacumulable.

SVHC : Sustancias extremadamente preocupantes.

Difference Report

Revisión: N°8 (04/02/2019) / Versión: N°2 (22/02/2019)

~~Revisión: N°6 (21/09/2017) / Versión: N°4 (25/09/2017)~~

- Made under licence of European Label System® MSDS software from InfoDyne - http://www.infodyne.fr -

SECCIÓN 2 : IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

En conformidad con el reglamento (CE) n° 1272/2008 y sus adaptaciones.

~~CAS 68439-46-3~~ ~~ALCOHOL ETOXILADO C9 C11~~
CAS 26183-52-8 ALCOHOL ETOXILADO C10
EC 230-525-2 CLORURO DE DIDECILDIMETILAMONIO

SECCIÓN 3 : COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

Composición :

~~CAS: 68439-46-3~~ ~~ALCOHOL ETOXILADO C9 C11~~	~~GHS07, GHS05~~ ~~Dgr~~ ~~Acute Tox. 4, H302~~ ~~Eye Dam. 1, H318~~		~~2.5 <= x % < 10~~
CAS: 26183-52-8 ALCOHOL ETOXILADO C10	GHS07, GHS05 Dgr Acute Tox. 4, H302 Eye Dam. 1, H318		2.5 <= x % < 10

SECCIÓN 7 : MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Almacenamiento

~~Almacenar lejos de la helada.~~

Almacenar a una temperatura entre 5°C y 35°C.

SECCIÓN 8 : CONTROLES DE EXPOSICIÓN/PROTECCIÓN INDIVIDUAL

8.2. Controles de la exposición

Usado en la dosis de uso, el producto no está clasificado y no requiere el uso de equipo de protección personal.

SECCIÓN 9 : PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Información importante en relación con la salud, la seguridad y el medio ambiente :

~~PH (solución acuosa) :~~ ~~11.2 +/- 0.5 (0.5% d.water)~~
~~Densidad :~~ ~~< 1~~
Densidad : 0.72 +/- 0.03 g/mL

9.2. Otros datos

~~No hay datos disponibles.~~

pH a 0.5% en solución acuosa : 11.2 +/- 0.5 (agua desmineralizada)
pH a 0.5% en solución acuosa : 10.3 +/- 0.5 (agua dura)

SECCIÓN 12 : INFORMACIÓN ECOLÓGICA

12.1.1. Sustancias

ALCOHOL ETOXILADO C10 (CAS: 26183-52-8)

Toxicidad para los crustáceos : CE50 = 15 mg/l
Especie : Daphnia sp.
Duración de exposición : 48 h
OECD Guideline 202 (Daphnia sp. Acute Immobilisation Test)

Toxicidad para las algas : CEr50 = 19.6 mg/l
Duración de exposición : 72 h
OECD Guideline 201 (Alga, Growth Inhibition Test)

12.2.1. Sustancias

ALCOHOL ETOXILADO C10 (CAS: 26183-52-8)

Biodegradación : no hay datos disponibles sobre la degradabilidad. La sustancia se considera como que no se degrada rápidamente.

- Made under licence of European Label System® MSDS software from InfoDyne - http://www.infodyne.fr -

SECCIÓN 15 : INFORMACIÓN REGLAMENTARIA

-Información relativa a la clasificación y al etiquetado que figura en la sección 2:

~~Reglamento (CE) n° 1272/2008 modificado por la normativa (UE) n° 2016/1179. (ATP 9)~~

Reglamento (CE) n° 1272/2008 modificado por la normativa (UE) n° 2018/669 (ATP 11)

- Sistema normalizado americano de identificación de los peligros presentados por el producto para las intervenciones de emergencia (NFPA 704) :

~~NFPA 704, Etiquetado : Salud=3 Inflamabilidad=1 Inestabilidad/Reactividad=1 Riesgo específico=none~~

SECCIÓN 16 : OTRA INFORMACIÓN

Version PRO.

Abreviaturas :

~~ADR : Acuerdo europeo relativo al transporte internacional de mercancías peligrosas por carretera.~~

~~IMDG : International Maritime Dangerous Goods.~~

~~IATA : International Air Transport Association.~~

~~OACI : Organización de Aviación Civil Internacional.~~

~~RID : Regulations concerning the International carriage of Dangerous goods by rail.~~

- Made under licence of European Label System® MSDS software from InfoDyne - http://www.infodyne.fr -

ALKAZYME®

Detergente desinfectante enzimático alcalino

Para la limpieza y la desinfección
por inmersión
de los dispositivos medicales
invasivos y no invasivos

Dilución 0,5%

Noticia técnica

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

Índice

Declaración de conformidad 3
Presentación 4
Ámbito de utilización 4
Características 4
Presentaciones Comerciales 4
Utilización 5
Información reglamentaria 5
Preparación de la solución de ALKAZYME 6
Modo de empleo 6
Tiempo de renovación de la solución utilizada 7
Protocolo combinado con desinfectante ALKACIDE 7
Precauciones de empleo 7
Manipulación - Puesta en servicio - Almacenamiento 8
Dispersión accidental - Eliminación 8
Datos físico-químicos 9
Composición 9
Características físico-químicas 9
Datos microbiológicos 10
Ensayos de determinación de la actividad en el Biofilm (Biopelícula) 10
Ensayos de determinación de la actividad bactericida 13
Ensayos de determinación de la actividad levuricida 16
Ensayos de determinación de la actividad virucida 17
Datos toxicológicos y eco toxicológicos 19
Toxicidad 19
Eco toxicidad 21
Biodegradabilidad 21
Datos de compatibilidad 22
Análisis de estudios de compatibilidad con diferentes materiales 22
Certificados de compatibilidad 23

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

Declaración de conformidad

SODEL garantiza y declara que el producto **ALKAZYME** cumple los requisitos esenciales de la Directiva 93/42/CEE de 14 junio de 1993 relativa a los Dispositivos Médicos.

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

CE 0459 1999

SODEL declara que el producto **ALKAZYME** no contiene:

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

Presentación

Ámbito de utilización

ALKAZYME está destinado al tratamiento previo o a la limpieza desinfectante desproteinizante mediante inmersión directamente después de la utilización y antes de la esterilización o desinfección:

- de los dispositivos médicos invasivos y no invasivos,
- de instrumental médico-quirúrgico contaminado,
- del material de endoscopia flexible y rígido para cavidades estériles y cavidades no estériles.

Características

- ALKAZYME transforma instantáneamente el agua dura en agua blanda para impedir la formación de depósitos calcáreos y la mineralización de los biofilms.
- ALKAZYME limpia, elimina, hidroliza contaminantes, materias orgánicas (pus, sangre, secreciones, etc.) que inhiben significativamente la acción de los desinfectantes.
- ALKAZYME está especialmente indicado para la limpieza de material de endoscopia, para desatascar circuitos de insuflación de aire o de agua del canal operador de endoscopios flexibles y rígidos, ya que hidroliza las proteínas, las mucosidades y los exudados.
- ALKAZYME es bactericida, levuricida y actúa contra el virus del VIH, de la Hepatitis B, de la Hepatitis C y del Herpes simplex.
- ALKAZYME protege el medio ambiente al destruir las bacterias Gram+ y Gram- en aguas de lavado, reduciendo así la contaminación cruzada.
- ALKAZYME protege al personal durante la operación de limpieza y reduce el nivel de contaminación del instrumental tratado.
- La utilización de ALKAZYME permite optimizar el procedimiento de esterilización/desinfección.

Presentaciones Comerciales

Referencia	Envase	Embalaje
ALKAZYME en dosis solubles en agua		
La dosis soluble en agua permite diluir directamente ALKAZYME con su envase evitando el contacto con la piel.		
ALKE176	Bolsa de 12 dosis de 20 g	42 bolsitas

Utilización

Información reglamentaria

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

LOT XXXXXXXXXXXX

AAAA.MM

o

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

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

Información reglamentaria conforme al reglamento CLP: (CE) n°1272/2008 y sus modificaciones	
Símbolos de peligro	
Palabra de advertencia	PELIGRO
Identificadores del producto	CAS 68439-46-3 ALCOHOL ETOXILADO C9 C11
Menciones de peligro	H315 Provoca irritación cutánea. H318 Provoca lesiones oculares graves. H412 Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
Consejos de prudencia	P102 Mantener fuera del alcance de los niños. P273 Evitar su liberación al medio ambiente. P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. P302 + P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua. P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado. P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o un médico. P501 Eliminar el contenido/el recipiente como un residuo peligroso.

- Según los estudios, el polvo ALKAZYME es:
  - no peligroso por inhalación

- Según los estudios, la solución ALKAZYME 0.5% es :
  - no peligroso en caso de ingestión
  - no irritante para la piel
  - no sensibilizante para la piel
  - no irritante para los ojos

Preparación de la solución de ALKAZYME

Modo de preparación de la solución diluida de ALKAZYME al 0,5%

- Llenar un contenedor de desinfección graduado con agua de la red tibia (30-40°C) al volumen final deseado.
  El agua tibia favorece la limpieza y la actividad de la enzima.
- Añadir la dosis de ALKAZYME necesaria (5g/L), según la tabla siguiente:

Medida	Cantidad	Volumen de agua
Dosis solubles en agua	1 dosis de 20 g	4 litros

- Agitar inmediatamente con un agitador o con la mano con los guantes con puño de tamaño y calidad apropiada hasta disolución completa del polvo.
- Use ALKAZYME diluido al 0,5% inmediatamente después de la dilución.

Incompatibilidades de ALKAZYME

- La solución de ALKAZYME no deberá mezclarse con otros productos de limpieza o de desinfección.
- ALKAZYME, como todo producto con pH alcalino, es incompatible con el aluminio.

Modo de empleo

Inmersión / para la limpieza y la desinfección:

- Los dispositivos médicos abiertos y desmontados (y sus accesorios) deben ser sumergidos completamente en el baño ALKAZYME durante 15 minutos.
  Si es necesario, limpiar las superficies sucias.
- Los endoscopios se pueden limpiar con una toallita humedecida con solución ALKAZYME para eliminar la suciedad más grande.

Inmersión / para la limpieza manual:

- Los dispositivos médicos abiertos y desmontados (y sus accesorios) deben ser sumergidos completamente en el baño ALKAZYME durante 5 minutos para facilitar la limpieza con un cepillo. Cepille los dispositivos médicos para eliminar todas las manchas visuales.
- Para endoscopios: el endoscopio debe ser sumergido completamente en el baño ALKAZYME. Irrigar los canales para el tiempo apropiado, limpiar el externo y cepillar los canales.

Enjuague

- El enjuague exterior y la irrigación interior se harán con agua de la red. Se enjuagar abundantemente para eliminar cualquier residuo de producto y evitar cualquier fuente de corrosión en el momento de la esterilización.
- El operador debe asegurarse de que los canales de los dispositivos y las partes huecas o complejas se enjuaguen abundantemente, preferiblemente con agua a presión.

Plazo de renovación de la solución utilizada

- La solución lista para su uso, en caso de ser utilizada, deberá renovarse como máximo todos los días o más frecuentemente en cuanto la solución esté visiblemente contaminada.

Plazo de renovación de la solución diluida
■ **En cuanto la solución esté sucia**
■ **A más tardar, cada 24h**

- El recipiente de inmersión se limpiará-desinfectará con ALKAZYME, se enjuagará y se secará antes de cada nuevo baño.

Protocolo combinado con desinfectante ALKACIDE

- Los ensayos en laboratorio realizados por el GERMANDE (Grupo de Estudios y de Investigación sobre Máquinas Automáticas de Limpieza y Desinfección de Endoscopios) demuestran la eficacia específica del protocolo de limpieza desinfectante desproteinizante de ALKAZYME en asociación con el protocolo de desinfección ALKACIDE.
- Este protocolo valida las condiciones de utilización de ALKAZYME y de ALKACIDE en relación con las conclusiones de los ensayos de determinación de la actividad microbiológica en función de:
  - la disciplina
  - el tipo de material
  - el volumen de material
  - la frecuencia de utilización de los dispositivos
  - el equipamiento de limpieza y de desinfección.

Precauciones de empleo

- La preparación de la solución lista para su uso y su utilización requieren el uso de guantes y de ropa de protección adecuados.
- La utilización reiterada de ALKAZYME sin protección podría provocar irritación cutánea y lesiones oculares.

Manipulación - Puesta en servicio - Almacenamiento

- ALKAZYME deberá conservarse en su envase y con su etiquetado original, con la descripción de su modo de utilización y sus precauciones de uso y de seguridad.
- ALKAZYME deberá almacenarse bien cerrado, en un lugar seco protegido de heladas y de la humedad y alejado de cualquier fuente de calor.
- Si, accidentalmente y durante un tiempo prolongado, el producto se encuentra cerca de una fuente de calor intenso, es preferible no reutilizar el producto ya que sus cualidades, sus propiedades y sus características podrían haberse degradado.
- ALKAZYME caduca a los tres años a partir de la fecha de fabricación.

Fecha de caducidad
3 años después de la fecha de fabricación, indicada en la etiqueta del siguiente modo: AAAA.MM (Año-Mes)

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

Dispersión accidental - Eliminación

- Debe recuperarse con precaución el contenido de los envases dañados y eliminar los recipientes y las materias sólidas en un centro autorizado.
- El envase del producto debe eliminarse como residuo peligroso bajo la total responsabilidad del tenedor de dichos residuos. Después de enjuagar con agua, el envase puede eliminarse como residuo no peligroso.
- El producto vertido se recuperará por medios mecánicos (barrido/aspiradora).

Datos físico-químicos

Composición

Fosfatos, Tensioactivos catiónico y non iónico, Enzima proteolítica, Desinfectante, Perfume

Características físico-químicas

Aspecto	Polvo fino
Color	Blanco
Olor	Almendra
Densidad	No comprimido: 0,72 ± 0,03
pH de ALKAZYME al 0,5 % **en agua blanda:** **en agua dura:**	 11,2 ± 0,5 10,3 ± 0,5

Datos microbiológicos

Ensayos de determinación de la actividad en el Biofilm (Biopelícula)

Recordatorio de definición de Biofilm

- *El Biofilm es un ecosistema bacteriano contenido en una matriz constituida por proteínas y polisacáridos. El conjunto forma una capa espesa de algunas micras a algunos milímetros y se adhiere con fuerza a las superficies.*
- *El Biofilm se forma en todas las superficies sumergidas o en soportes a menudo humidificados. Comprende numerosas especies bacterianas y, en ocasiones, algas microscópicas.*
- *La multiplicación de las bacterias provoca, posteriormente, su espesamiento en unas horas o en unos meses. La matriz ancla el Biofilm al soporte.*
- *En entorno médico, el Biofilm supone un peligro ya que es resistente a la limpieza y limita la penetración de los desinfectantes, debido a su fuerte adherencia, y puede contener bacterias patógenas que no podrán destruirse mediante desinfección o esterilización.*

- Existen estudios que demuestran la acción enzimática detergente de ALKAZYME sobre las proteínas y sobre las del Biofilm.
- ALKAZYME prepara las condiciones óptimas para lograr la desinfección o la esterilización.

Ensayos de determinación de la actividad detergente en un biofilm

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Pseudomonas aeruginosa*
Tiempo de contacto:	5 minutos
Temperatura:	40°C
Concentración:	0,5%

Informe de ensayo n°97-265 de 02/1998
Laboratorio de bacteriología, virología y microbiología industrial
Facultad de Farmacia – Toulouse (Francia)

Conclusión: Los resultados de los recuentos bacterianos y las dosificaciones de las cantidades residuales de proteínas o de polisacáridos en la superficie del soporte demuestran que a 40°C una solución de ALKAZYME a 0,5% provoca:

- a partir de 30 segundos de contacto, una desestructuración importante del biofilm asociada a una reducción notable (3,3 log/cm^2) del número de bacterias adheridas a la superficie del soporte, y
- al cabo de 5 minutos de contacto, una eliminación total del biofilm (bacterias, proteínas y polisacáridos).

El análisis de los resultados presentados anteriormente, confirmados por las observaciones con microscopio electrónico de barrido, indica que, en las condiciones experimentales descritas, el producto ALKAZYME utilizado a 0,5% y a 40°C durante 5 minutos presenta una muy buena actividad detergente frente a un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa.*

Determinación de la efectividad de la limpieza en una suspensión de esporas bacterianas *Bacillus subtilis* con sangre añadida

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Bacillus subtilis*
Sustancias interferentes:	Sangre de ovejas
Tiempo de contacto:	2 minutos
Temperatura:	20°C
Concentración:	0,5%

Informe de ensayo n°153/0295 del 15/05/1995
I.R.M.- Institut de Recherche Microbiologique (Instituto de Investigación Microbiológica)

Conclusión: Los resultados de los recuentos de esporas realizados después de una inmersión de 2 minutos de tubos plásticos flexibles contaminados en un baño de ALKAZYME demuestran que el producto ALKAZYME diluido al 0,5% (m/v) en agua dura a 30°f permite un desprendimiento más importante de las esporas de *Bacillus subtilis* preparadas en restos de sangre seca.

En relación con la acción testigo del agua dura a 30°f utilizada sola, el producto ALKAZYME aumenta el desprendimiento de las esporas en un 60%.

En las manipulaciones, el examen visual permitió constatar que en el baño de ALKAZYME el desprendimiento de las esporas se producía rápidamente y de manera homogénea en el conjunto del depósito, dando la clara impresión de una limpieza más eficaz que en el baño de agua dura sola.

Determinación de la actividad detergente de ALKAZYME en un biofilm de *E. coli*

Condiciones del ensayo	
Cepas	*Escherichia coli*
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C
Concentración:	0,5%

Informe de ensayo n°04-004
Laboratorio de Higiene Hospitalaria, Facultad de Medicina - Strasbourg (Francia)

Conclusión: Utilizado en las condiciones de concentración, de temperatura y de tiempos recomendados por el laboratorio Alkapharm, ALKAZYME (0,5%, 15 min., 20°C) permite obtener una acción detergente importante en el biofilm de *E.coli* CIP 57124 producido en tubos de hemólisis de vidrio.

Relación de los estudios hospitalarios de referencia en los que se compara las actividades detergentes de los productos presentes en el mercado:

- Estudio del poder proteolítica de los detergentes desinfectantes enzimáticos.
  J. Martino*, L. Crine*, P. Quillet**, M. Schoeps**, C. Dupont*
  *Servicio farmacia, **Laboratorio de Bioquímica, Hospital Corbeil-Essonnes (Francia)

- Pre-desinfectantes cumplen con los requisitos de buenas prácticas en farmacia hospitalaria?
  F. Rochereau, X. Renan, Equipo de esterilización, C. Descampeaux
  Servicio farmacia-esterilización, Hospital Público del Cotentin, Cherbourg-Octeville (Francia)

- Evaluación de la limpieza de los pre-desinfectantes enzimáticos o non enzimáticos
  N. Boubekeur, M.H. Pic, C. Bourret
  Servicio farmacia-esterilización, Hospital François Quesnay, Mantes-la-Jolie (Francia)

- Comparación de la eficiencia de los pre-desinfectantes en esterilización central
  C. Pichard, D. Reittar, A. Pont-Lacoat, B. Coret-Houbart, A. Fabreguettes
  Servicio farmacia, Hospital Robert Ballanger, Aulnay sous Bois (Francia)

- Evaluación del método que combina pre-desinfección y lavado automatizado por análisis de los suelos
  C. Paumier*, A. Jacolot, C. Gendron, G. Munnier, O. Petitjean
  Esterilización central, Hospital Universitario Avicenne (APHP), Bobigny (Francia)

Ensayos de determinación de la actividad bactericida

Norma NF EN 1040 (abril de 2006)

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus*
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C
Concentración:	0,1%

Informe de ensayo n° 139-1REA10CI1 del 23/09/2010
Laboratorio SCIENTIS

Conclusión: El producto ALKAZYME, lote 2008.05.01.44, es conforme a la norma NF EN 1040. Presenta una actividad bactericida a 20°C y en 15 minutos de contacto.

Norma NF EN 13727 (julio de 2004)

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus* *Enterococcus hirae*
Sustancias interferentes:	Condiciones de suciedad: mezcla de albumina bovina a 3 g/l y eritrocitos de oveja 3 ml/l
Tiempo de contacto:	15 minutos ± 10 sec.
Temperatura:	20°C± 1°C
Concentración:	0,5%

Informe de ensayo n° C 05-0560c del 29/06/2005
Laboratorio KEYBIO

Conclusión: Según la metodología descrita en la norma EN 13727 (julio de 2004) y bajo las condiciones de prueba, el lote 2005-02-01-44-918 del producto ALKAZYME detergente desinfectante proteolítico alcalino, presenta una actividad bactericida en 15 min. y en 60 min. a 20°C en condiciones de suciedad (mezcla de albumina bovina 3 g/l – eritrocitos de oveja) cuando se diluye al 0,5% (m/v) en agua dura en relación con las cepas de referencia de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus hirae*.

Norma NF EN 13727 (julio de 2004) sobre *Acinetobacter baumannii*

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Acinetobacter baumannii*
Sustancias interferentes:	Condiciones de suciedad: albumina bovina a 3 g/l y eritrocitos de oveja 3 ml/l
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C
Concentración:	0,5%

Informe de ensayo n° 015-1 REA 11 del 14/03/2011
Laboratorio SCIENTIS

Conclusión: El producto ALKAZYME, lote 2009.08.01.44, es conforme a la norma EN 13727. Posee una actividad bactericida en la cepa *Acinetobacter baumannii* en condiciones de suciedad, a 20°C y en 15 minutos de contacto, a una concentración del 0,5% (v/v).

Evaluación de la actividad bactericida de ALKAZYME utilizando una prueba cuantitativa de portadora superficie dura

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus* *Salmonella choleraesuls*
Sustancias interferentes:	Suero bovino al 5%
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C
Concentración:	0,5%

Informe de ensayo Pr Syed A. SATTAR de 12/1995
Universidad de Ottawa (Canadá) - Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología e Inmunología

Conclusión: Para 3 lotes de desinfectantes probados en 3 ensayos, el producto ALKAZYME es bactericida en las cepas *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella choleraesuls* a una concentración del 0,5%, en 15 minutos de contacto, a 20°C, según el método de los porta gérmenes y reduce la población bacteriana de 5 a 7 log.

Determinación de la actividad bactericida y del poder complejante - Simulación de las condiciones prácticas de uso en soportes de acero inoxidable

Condiciones del ensayo	
Cepas	*Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus*
Sustancias interferentes:	Condiciones de suciedad (campo médico): - SI 1: 3g/l albumina bovina + 3ml/l eritrocitos de oveja - SI 2: 3ml/l eritrocitos de oveja
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C
Concentración:	0,5% (baño de 5L)

Informe de ensayo n° 191-1 REA 10 del 21/12/2010
Laboratorio SCIENTIS

Conclusión: El producto ALKAZYME, lote 2008.05.01.44, presenta:

- una actividad bactericida superior a 7 log en las cepas *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* según el protocolo del ensayo, en 15 minutos de contacto, a una concentración del 0,5 %, a 20°C y en presencia de sustancias interferentes:
  - en los soportes sometidos a prueba (dispositivos médicos)
  - en los efluentes (baños de desinfección)
- un poder complejante que permite transformar un agua inicialmente calificada como “dura” en agua “blanda”.

Estudio de la actividad bactericida de una solución desinfectante con siembra repetitiva y sucesivas adiciones de la sustancia interferente de la proteína

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Pseudomonas aeruginosa*
Sustancias interferentes:	Albumina bovina a 0,3% (p/v)
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C ± 1°C
Concentración:	0,5%
Número de repeticiones:	5 veces durante 2 días (siembra + adición de sustancia interferente)

Informe de ensayo n° 867/0294 del 09/03/1994
I.R.M.- Instituto de Investigaciones Microbiológicas

Conclusión: Se puede concluir que un baño de ALKAZYME al 0,5%, preparado en agua dura debería soportar 5 inmersiones sucesivas de objetos sucios y contaminados representando cada vez añadidos de interferencias proteicas y contaminantes microbianos, antes de perder toda actividad de descontaminación.

Ensayos de determinación de la actividad levuricida

Norma NF EN 1275 (junio de 1997)

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Candida albicans*
Tiempo de contacto:	15 minutos ± 10 sec.
Temperatura:	20°C ± 1°C
Concentración:	0,5%

Informe de ensayo n° 285/0697-2 del 13/06/1997
I.R.M.- Instituto de Investigaciones Microbiológicas

Conclusión: El producto ALKAZYME es levuricida según la metodología de la norma europea NF EN 1275 (junio de 1997), en 15 minutos de contacto a 20°C en la cepa de referencia *Candida albicans* ATCC 10231, a una concentración del 0,5% (m/v).

Norma NF EN 13624 (abril de 2004)

Condiciones del ensayo	
Cepas:	*Candida albicans*
Sustancias interferentes:	Condiciones de suciedad: albumina bovina a 3g/l y eritrocitos de oveja 3g/l
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C
Concentración:	0,25%

Informe de ensayo n° 008-2REA08 del 29/07/2008
Laboratorio SCIENTIS

Conclusión: El producto ALKAZYME, lote 2005.09.02.44, presenta una actividad levuricida en condiciones de suciedad, a 20°C y en 15 minutos de contacto a una concentración del 0,25% (m/m).

Ensayos de determinación de la actividad virucida

Norma NF EN 14476+A1 (enero de 2007) en el Virus de Inmunodeficiencia Humana

Condiciones del ensayo	
Cepa:	VIH
Sustancias interferentes:	Condiciones de suciedad: 3g/l de albumina bovina y 3ml de eritrocitos de oveja
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C ± 1°C
Concentración:	0,5%

Informe de ensayo n° 079V4-2012 del 17/07/2012
Laboratorio APEX Bio Ssolutions

Conclusión: Los ensayos realizados sobre el producto ALKAZYME, lote 2011.09.01.44, demostraron que el producto utilizado al 0,5% posee una actividad virucida en el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) según la metodología de la norma NF EN 14476+A1, durante 15 minutos de contacto a 20°C, en condiciones de suciedad.

Norma NF EN 14476+A1 (enero de 2007) en el Virus Herpes simplex

Condiciones del ensayo	
Cepa:	Virus del herpes simplex de tipo 1
Sustancias interferentes:	Condiciones de suciedad: 3g/l de albumina bovina y 3g/l de eritrocitos de oveja
Tiempo de contacto:	1, 5,15 y 60 minutos
Temperatura:	20°C ± 1°C
Concentración:	0,5%

Informe de ensayo A10ML1149-3H del 20/01/2011
Laboratorio MikroLab

Conclusión: El desinfectante ALKAZYME se ha utilizado en concentraciones del 0,5% a 20°C en 1, 5, 15 y 60 minutos de tiempo de contacto. Al cabo de un minuto se observa una reducción del título de virus ≥ 4 unidades log10. Por tanto, se obtiene la eficacia con ALKAZYME: 0,5 % 1 minuto condiciones de suciedad.

Norma NF EN 14476+A1 (enero de 2007) en el Virus de la Hepatitis B

Condiciones del ensayo	
Cepa	Pseudorabies virus (PRV)
Sustancias interferentes:	Condiciones de suciedad: 3g/l de albumina bovina y 3ml/l de eritrocitos de oveja
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C ± 1°C
Concentración:	0,5%

Informe de ensayo 041V04-2014-01 del 10/04/2014
Laboratorio APEX Bio Solutions

Conclusión: Los ensayos realizados en el producto ALKAZYME lote n°2012.04.01.44 han demostrado que el producto utilizado a una concentración del 0,5% tiene una actividad virucida en el virus de la hepatitis B (virus modelo PRV), según la metodología de la norma NF EN 14476+A1, en 15 minutos de contacto a 20°C, en condiciones de suciedad.

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

Condiciones del ensayo	
Cepa	Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV)
Sustancias interferentes:	Condiciones de suciedad: 3g/l de albumina bovina y 3ml/l de eritrocitos de oveja
Tiempo de contacto:	15 minutos
Temperatura:	20°C ± 1°C
Concentración:	0,5%

Informe de ensayo 041V03-2014-01 del 10/04/2014
Laboratorio APEX Bio Solutions

Conclusión: Los ensayos realizados en el producto ALKAZYME lote n°2012.04.01.44 han demostrado que el producto utilizado a una concentración del 0,50% tiene una actividad virucida en el virus de la hepatitis C (virus modelo BVDV), según la metodología de la norma NF EN 14476, en 15 minutos de contacto a 20°C, en condiciones de suciedad.

Datos toxicológicos y eco toxicológicos

Toxicidad

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

Polvo ALKAZYME

- **DL0 > 2.000 mg/kg**
- **Preparación no peligrosa en caso de ingestión accidental**

Informe de ensayo n° T 265/4544 del 30/06/1994
EVIC-CEBA -Laboratorio de investigación y de experimentación

Conclusión: En las condiciones experimentales adoptadas, la LDO oral del preparado ALKAZYME polvo - Lote 403161 en ratones macho y hembra fue superior a 2000 mg/kg.

La interpretación de los resultados de conformidad con la Directiva 67/548/CEE permite clasificar la preparación de ensayo como no peligrosas en caso de ingestión.

Polvo ALKAZYME diluido al 0,5%

- **DL0 > 40.000 mg/kg**
- **Preparación no peligrosa en caso de ingestión accidental**

Informe de ensayo n° T266/4544 del 1 de julio de1994
EVIC-CEBA -Laboratorio de investigación y de experimentación

Conclusión: En las condiciones experimentales adoptadas, la LDO oral del preparado ALKAZYME polvo - Lote 403161 a 0,5% en agua destilada en ratones macho y hembra fue superior a 40 g/kg.

La interpretación de los resultados de conformidad con la Directiva 67/548/CEE permite clasificar la preparación de ensayo como no peligrosas en caso de ingestión.

Toxicidad aguda por inhalación según la línea directriz 403 de la OCDE (2009)

Polvo ALKAZYME

- **4-h LC_{50} > 0,065 mg/L**
- **Diámetro medio en masa de las partículas: 3,46 µm**
- **Polvo no tóxico por inhalación**

Informe de ensayo n° RF - 14706.309/080.13 del 13/03/2014
BIOAGRI – A Merieux NutriSciences Company

Conclusión: La concentración media letal combinada (machos y hembras) durante un período de exposición de 4 horas (4-h LC_{50}) a ALKAZYME inhalado por ratas Wistar Hannover por la nariz solamente es superior a 0,065 mg/L.

Cuando se prueba a la concentración máxima alcanzable en la atmósfera, ALKAZYME no causa toxicidad aguda por inhalación en ratas Wistar Hannover durante un período de exposición nasal de 4 horas.

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

Polvo ALKAZYME diluido al 0,5%
■ Preparación no irritante para la piel

Informe de ensayo n° T305/5090 del 05/07/1994
EVIC-CEBA -Laboratorio de investigación y de experimentación

Conclusión: Según la Directiva 67/548/CEE, la preparación desinfectante ALKAZYME – lote 303051.3 diluido al 0,5% en agua destilada no es irritante para la piel.

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

Polvo ALKAZYME diluido al 0,5%
■ Preparación no irritante para los ojos

Informe de ensayo n° T 306/5090 del 18/07/1994
EVIC-CEBA -Laboratorio de investigación y de experimentación

Conclusión: Según la Directiva 67/548/CEE, la preparación desinfectante ALKAZYME – lote 303051.3 diluido al 0,5% en agua destilada no es irritante para los ojos.

Evaluación del potencial de sensibilización cutánea en los animales de laboratorio según la línea directriz 406 del OCDE (1992)

Polvo ALKAZYME diluido al 0,5%
■ Preparación no sensibilizante por contacto con la piel

Informe de ensayo n° Te 772/98-4556 del 9 de febrero de 1999
EVIC-CEBA -Laboratorio de investigación y de experimentación

Conclusión: Teniendo en cuenta los criterios de juicio adoptado, la preparación de ALKAZYME diluida al 0,5% en agua para inyección (agua PPI) se clasificó como no sensibilizante por contacto con la piel (Clase 1).

Eco toxicidad

Determinación de la toxicidad aguda de los peces según la línea directriz 203 de la OCDE - Prueba de límites

Polvo ALKAZYME diluido al 0,5%
■ **CL_{50}-96h entre 0,10g/L y 0,01g/L**

Informe de ensayo n° RE-12/10836 del 13/08/2012
IANESCO / Laboratorio BFB

Conclusión: El preparación de prueba ALKAZYME no muestra toxicidad aguda a los peces (Diano rerio), a la concentración ensayada.

Determinación de la inhibición de la movilidad de Daphnia magna Straus según la norma NF EN ISO 6341 (mayo de 1996), y

Determinación de la inhibición del crecimiento de algas de agua dulce con algas verdes según la norma NF EN ISO 8692 (mayo de 2005)

Polvo ALKAZYME diluido al 0,5%
■ **CE_{50}i-48h: 2,90 mg/L para las dafnias**
■ **CEr_{50}: 39,6 mg/L para las algas verdes**

Informe de ensayo n° RE-12/06203 del 22/05/2012
IANESCO

Biodegradabilidad

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

Polvo ALKAZYME
■ **Biodegradación superior al 70% (94%) en 28 días**

Informe de ensayo n° RN05-10014.002 del 16/01/2006
Laboratorio SGS

Conclusión: Para este análisis, la biodegradación de la sustancia de ensayo fue superior al 70% en 28 días (94%). La muestra ALKAZYME, lote 2005.09.06.44, es por lo tanto "**totalmente biodegradable**" según los criterios de la OCDE.

Datos de compatibilidad

De acuerdo con los estudios de compatibilidad material y con muchos años de experiencia con el producto, ALKAZYME se considera como compatible con: Acero inoxidable, policarbonato, polietileno, polipropileno, PEEK, EPDM, FPM / FKM, PTFE, Poliamida.

Contra-indicaciones: Aluminio

Análisis de estudios de compatibilidad con diferentes materiales

Estudio de la acción corrosiva de un limpiador descontaminante sobre instrumentos médicos y quirúrgicos reutilizables según el método de ensayo descrito en la norma francesa NF S 94-402/1 (diciembre de 1992)

Polvo ALKAZYME diluido al 0,5%
■ **50 inmersiones de 15 minutos: no corrosión de tijeras de iridectomía**

Informe de ensayo n°8090155 del 05/11/1998
LNE – Laboratorio Nacional de Pruebas (Francia)

Conclusión: De acuerdo con las condiciones del ensayo, el producto limpiador descontaminante ALKAZYME no es corrosivo.

Evaluación de la conservación de los dispositivos médicos en el Alkazyme después de su uso el fin de semana

Polvo ALKAZYME diluido al 0,5%
■ **Compatibilidad con instrumentos de calidad de servicio: mango de bisturí, tijeras, pinzas hemostáticas, porta-agujas, espéculo nasal, cureta y pinza de disección** ■ **Compatibilidad con instrumentos de quirófano: mango de bisturí, tijeras, pinzas hemostáticas, porta-agujas, espéculo nasal, cureta y pinza de disección, tijeras de gubia**

Estudio realizado por el Departamento de Farmacia, Esterilización
Hospital Robert Ballanger (Francia)

Conclusión: Nuestro estudio mostró que la corrosión de los instrumentos usados y inmersos en Alkazyme® es baja. Estos resultados confirman nuestra práctica de mantener los instrumentos inmersos en el desinfectante después de su uso, en lugar de recomendar su enjuague con agua y secado (esta etapa nunca es óptima) o incluso su conservación en agua. De hecho, el agua causa corrosión significativa de los instrumentos y consecuentemente su deterioro acelerado.

Los resultados obtenidos con los nuevos instrumentos son más a favor de la inmersión de los instrumentos en Alkazyme® que en el agua, y esto incluso para un tiempo de inmersión de hasta siete días.

El ablandamiento del agua parece ser un elemento de explicación de la menor corrosión de los instrumentos inmersos en Alkazyme®.

Certificados de compatibilidad

Fabricante de endoscopios:

- **Olympus:** Por la presente recomiendo el producto ALKAZYME para la limpieza de los endoscopios Olympus. Este producto sigue siendo utilizado en nuestros servicios de limpieza de dispositivos, y muestra excelente desempeño de limpieza sin efectos secundarios.
- **Pentax:** Confirmamos que los productos de limpieza ALKAZYME y desinfección ALKACIDE no presentaron ningún inconveniente para los endoscopios PENTAX en diferentes sitios de uso, incluyendo en nuestro talleres de Servicio Post-Venta.

Fabricante / distribuidor de sondas:

- **Siemens-Acuson:** ALKAZYME está presente en la lista de productos aprobados por Siemens Acuson para la limpieza de sondas externas, endocavitarias y transesofágicas.
- **Hitachi:** Alkazyme es compatible con la mayoría de las sondas de ultrasonidos de nuestra gama.
- **Kretz:** Nos gustaría confirmar que las sondas de ultrasonido Kretz utilizadas en sus servicios (ginecología-obstetricia y radiología) son compatibles con el método de desinfección defendida por ALKAPHARM con el producto ALKAZYME.
- **Quantel:** Todas las pruebas no reveló anomalías (ataques el revestimiento de las sondas, la humedad, depósito) y no se ha detectado un mal funcionamiento en la ecografía. El desmontaje de las sondas y sus experiencias no mostró ningún signo de deterioro de los circuitos.
- **Medtronic:** Confirmamos que los productos de desinfección ALKAZYME y ALKACIDE del laboratorio ALKAPHARM se pueden utilizar en las sondas de sensores electrónicos GAELTEC que comercializamos.

Fabricante / distribuidor de varios equipos quirúrgicos:

- **Storz:** Podemos concluir que los productos ALKAZYME diluido al 0,5% y ALKACIDE diluido al 5%, de acuerdo con las condiciones de la prueba, NO SON CORROSIVOS para las partes metálicas y NO AGRESIVOS en ópticas y varias piezas de plástico, adhesivos y soldaduras del equipo quirúrgico ensayado.
- **BrainLAB:** El Hospital de la Universidad de Estrasburgo, con los que trabajamos, se recomienda un producto de desinfección, Alkazyme que utilizan con regularidad. BrainLAB también ha hecho pruebas con este producto y a pesar de que el pH es mayor que 9 (10,5), es muy adecuado para nuestros instrumentos.
- **Sopro:** Los productos utilizados, ALKAZYME y ALKACIDE, son compatibles para la descontaminación o desinfección de cámaras endoscópicas. Sin embargo, es imperativo que el usuario cumpla estrictamente con el protocolo de descontaminación o desinfección que promover.
- **Johnson & Johnson:** Las pruebas de compatibilidad realizadas por nuestra empresa en los Estados Unidos, entre nuestra cajas de esterilización Sterrad y la muestra de producto descontaminante Alkazyme que usted tuvo la amabilidad de proporcionarnos, demostrado han sido muy exitosa.
- **Bolusil:** Alkazyme está presente en la lista de productos cuya seguridad ha sido verificada.
- **ABS:** Confirmamos nuestro acuerdo para el uso de productos de limpieza y desinfección ALKAZYME y ALKACIDE con nuestra gama de catéteres de manometría esofágica y ano-rectal.

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE
VIROLOGIE & MICROBIOLOGIE
INDUSTRIELLE

35, chemin des Maraîchers
31062 TOULOUSE cedex 04

Dr PINEAU L.

ETUDE 97-265

Détermination de l'activité détersive d'ALKAZYME®

Rapport rédigé par : Lionel PINEAU
Docteur INPT
Responsable Assurance Qualité

Rapport vérifié par : Christine ROQUES
Pharmacien - Docteur UPS
Responsable Essais.

I - OBJECTIF DE L'ETUDE :

Evaluer l'activité détersive du produit ALKAZYME® (Alkapharm) vis à vis d'un biofilm mono-bactérien formé sur tube Tygon®.

II - MATERIEL ET METHODE :

II-1 : Souche bactérienne :

Pseudomonas aeruginosa CIP A22

II-1 : Milieux de culture :

II-1-a : Milieux d'entretien et de dénombrement des micro-organismes :

Gélose trypcase soja (Biomérieux) Lot N° 707033601

II-1-b : Milieux liquide utilisé pour la formation du biofilm :

La composition du substrat utilisé pour alimenter le circuit et favoriser la formation du biofilm est :

Acides aminés---------- 0,1 g/l
Extrait de levure---------- 0,1 g/l
$MgSO_4$, 2H2O---------- 0,2 g/l
$FeSO_4$, 7H20---------- 0,0005 g/l
Na_2HPO_4 anhydre---------- 1,25 g/l
KH_2PO_4---------- 0,5 g/l
Lactose---------- 0,025 g/l

II-1-c : Neutralisant :

Pour tous les détergents testés, le neutralisant utilisé pour neutraliser l'activité bactéricide du détergent à été conçu sur la base des indications fournies par le recueil de normes édité par l'AFNOR. La validité du neutralisant a été vérifiée pour la souche et le produit testé.

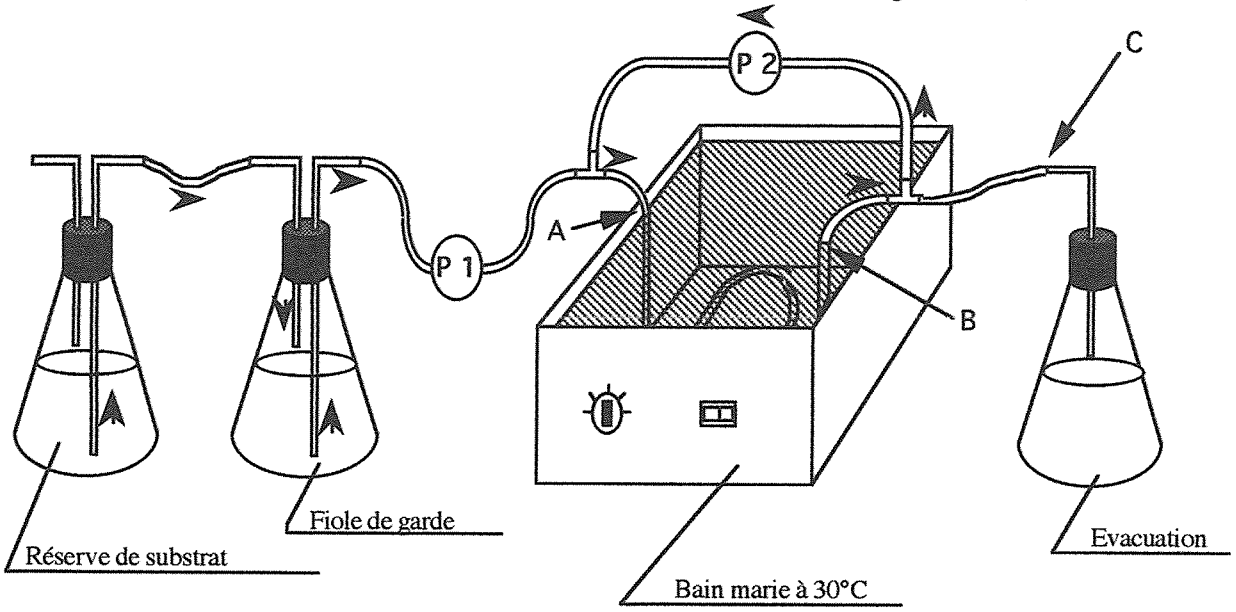
Composition: 1 jaune d'œuf + 10 ml d'une solution de thiosulfate de sodium à 5% + 5 ml de tween 80 (Sigma) + bouillon trypticase-soja (Biomérieux), (q.s.p. 100 ml).

II-1-d : Liquide de récupération :

La solution utilisée pour récupérer les bactéries adhérées, présentes sur la surface interne du tube Tygon® est identique à celle utilisée dans la norme AFNOR NFT 72 190 ("Méthode des portes-germes") pour décrocher les bactéries du support : NaCl (8,5 g), Tween 80 (5 ml), Eau distillée stérile q.s.p. 1000 ml.

II-2 : Méthode :

II-2-a : Formation du biofilm / montage expérimental (Figure N° 1):



P1 : Pompe d'alimentation en substrat (2,5 à 3 ml/min.).

P2 : Pompe servant à l'agitation du circuit (100 ml/ min.).

A-B : Zone de prélèvement des portions de tube. (90 cm).

B : Zone d'inoculation de la boucle.

A-B + Portion de tube contenant la pompe n°2 = 194 cm.

Figure 1 : Dispositif expérimental de formation des biofilms.

α : Pompes :

Les deux pompes utilisées (Masterflex, Bioblock Scientific, 87365, 900-229) servent respectivement:
- à l'alimentation de la boucle en substrat (pompe N°1) .Le débit de la pompe est alors réglé entre 2,5 et 3 ml/min.
- à l'agitation du contenu du circuit (pompe N°2) et sa vitesse de rotation est de l'ordre de 40 tours/min, soit 100 ml/min (flux de type laminaire).

L'ensemble du montage expérimental décrit dans la figure 1 est placé sous une hotte à flux laminaire.

χ : Inoculation du circuit :

Après avoir rempli le circuit avec le milieu de culture, les débits des pompes 1 et 2 sont réglés. L'inoculation est ensuite réalisée en injectant au niveau du point B, 5 à 10 ml d'une suspension bactérienne contenant environ 10^8 cellules par ml (pompe N°1 arrêtée). Le volume de l'inoculum est calculé de façon à obtenir au sein de la boucle, une concentration en micro-organismes de l'ordre de 10^7 bactéries par ml.

Une fois que l'inoculum a été ajouté, le circuit est maintenu sous agitation pendant une vingtaine de minutes (pompe N°1 arrêtée, pompe N°2 en marche). Cette étape permet de répartir les bactéries de l'inoculum dans la totalité de la boucle. Ce n'est qu'après cette phase d'homogénéisation que le circuit est alimenté en substrat par la pompe N°1.

δ : Prélèvement des portions de biofilm :

La portion de tube Tygon® utilisée pour les essais est prélevée, au niveau de la zone immergée dans le bain marie comprise entre les points A et B. Pour cela, les pompes 1 et 2 du circuit de formation du biofilm sont momentanément arrêtées. La surface externe du tube où est effectué le prélèvement est désinfectée à l'aide d'une compresse stérile imbibée d'alcool à 95°. A l'aide d'un scalpel stérile, une portion de tube est prélevée et immédiatement remplacée par une portion de tube stérile de même longueur.

II-2-b : Détermination de l'activité détersive :

α : Dénombrement des bactéries adhérées :

La portion de tube Tygon® prélevée (II-2-a-δ) est connectée à une pompe assurant la circulation de la solution testée à l'intérieur du tube test (Cf figure N°2) (230 ml/min).
Après chaque temps de contact défini (0,5; 1,5; 3; 5; 10 et 15 minutes) un échantillon de la portion de tube Tygon® d'environ 2 cm de long est prélevé et plongé dans 10 ml de neutralisant afin de stopper l'activité de la solution détergente.

Après cette étape de neutralisation (10 minutes), l'échantillon de tube Tygon ® égoutté est plongé dans 20 ml de liquide de récupération. Le tube est découpé longitudinalement en quatre tronçons identiques et les surfaces internes de chacune de ces portions sont raclées à l'aide d'une lame de scalpel stérile. Cette opération a pour but de remettre en suspension les micro-organismes résiduels du biofilm.
Les portions de tube et le liquide de récupération sont ensuite transférés dans un tube à essai et soumis à une agitation dans un appareil de type Vortex pendant environ 1 min. (Vortex 2, shake 5, Scientific industries, Bioblock, FRANCE).
A partir des 20 ml de la solution de grattage (suspension mère), une série de dilutions au 1/10° est réalisée. 2 x 1 ml de chacune de ces dilutions sont ensuite ensemencés en milieu trypticase soja gélosé (Biomérieux). Les ensemencements se font par inclusion. Après une incubation de 24 à 36 heures à 37°C en aérobiose, les colonies apparues sur les boites de Pétri sont dénombrées, et les résultats sont exprimés en nombre de bactéries viables par cm^2 de tuyau.

Parallèlement, pour chaque temps de contact et température d'essai une série "témoin" est réalisée en remplaçant la solution détergente par de l'eau distillée stérile.

β: Dosage des polysaccharides: méthode de Dubois et al. (1956)

Ce dosage repose sur la formation de composés furfuraliques par chauffage des oses neutres en milieu sulfurique concentré qui donnent avec le phénol des composés de coloration jaune que l'on peut doser par spectrophotométrie.

Après chaque temps de contact entre le produit étudié et le biofilm, une portion de tube Tygon® (2 cm) est prélevée selon la même technique que celle employée pour la mesure de l'activté détersive (II.2.b.α). Toutefois, ici, la portion de tube n'est pas plongée dans la solution neutralisante mais dans 3 ml d'eau distillée stérile.

δ: Dosage des protéines: méthode de Lowry et al. (1951)

La méthode est basée sur la formation d'un complexe bleu entre les liaisons peptidiques et les sels de cuivre et sur la réduction du réactif de Folin due aux groupements phénols des constituants des protéines (Tyrosine).

Le dosage est effectué sur les mêmes solutions que celles précédemment préparées pour le dosage des exopolysacharides (II.2.b. β).

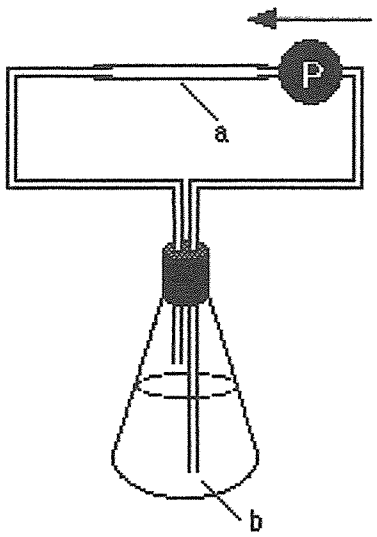


Figure 2 : Dispositif expérimental pour la détermination de l'activité détersive.

a : Portion de tube Tygon® soumise au traitement.
b : Solution d'Alkazyme® à 0,7% et 40°C.

II.2.d : Microscopie électronique à balayage :

Afin de confirmer ou d'infirmer les résulats des dénombrements bactériens (II-2-b), une analyse au microscope électronique à balayage de la surface interne du tube tygon® est également effectuée. Pour cela, après chaque temps de contact avec le produit Alkazyme®, une portion de tube tygon® de 2 cm est prélevée (Cf. II.2.b) puis traitée comme suit :

-fixation par immersion dans une solution de glutaraldéhyde a 2,5%,
-deshydratation par immersions successives dans une série de solutions d'éthanol à 30, 50, 75 et 100%,
-métalisation à l'or fin,
-examen au microscope électronique à balayage (Stereo 250MK3, Combridge Instruments).

III - RESULTATS :

	Temps de contact (min.)						
	0	0,5	1,5	3	5	10	15
TEMOIN (E.D.S)							
Log(nb. bactéries fixées/ cm^2)	7,66	7,27	7,11	7,14	7,13	7,11	7,09
ESSAIS (Alkazyme®)							
Log(nb. bactéries fixées/ cm^2)	7,66	3,35	2,8	1,3	0	0	0
Conc. proteines (μg/cm2)	16,8	7,5	7	0,3	0	0	0
Conc. polysaccharides (μg/cm2)	6,3	3,7	3	0	0	0	0

Tableau N°1 : Evolutions du nombre de bactéries viables (log.) encore fixées sur la surface interne du tube Tygon® et des concentrations en protéines et polysaccharides à la surface du support en fonction du temps de contact avec le produit Alkazyme® à 0,5% et à 40°C par rapport au témoin réalisé avec de l'eau distillée stérile à 40°C (E.D.S).

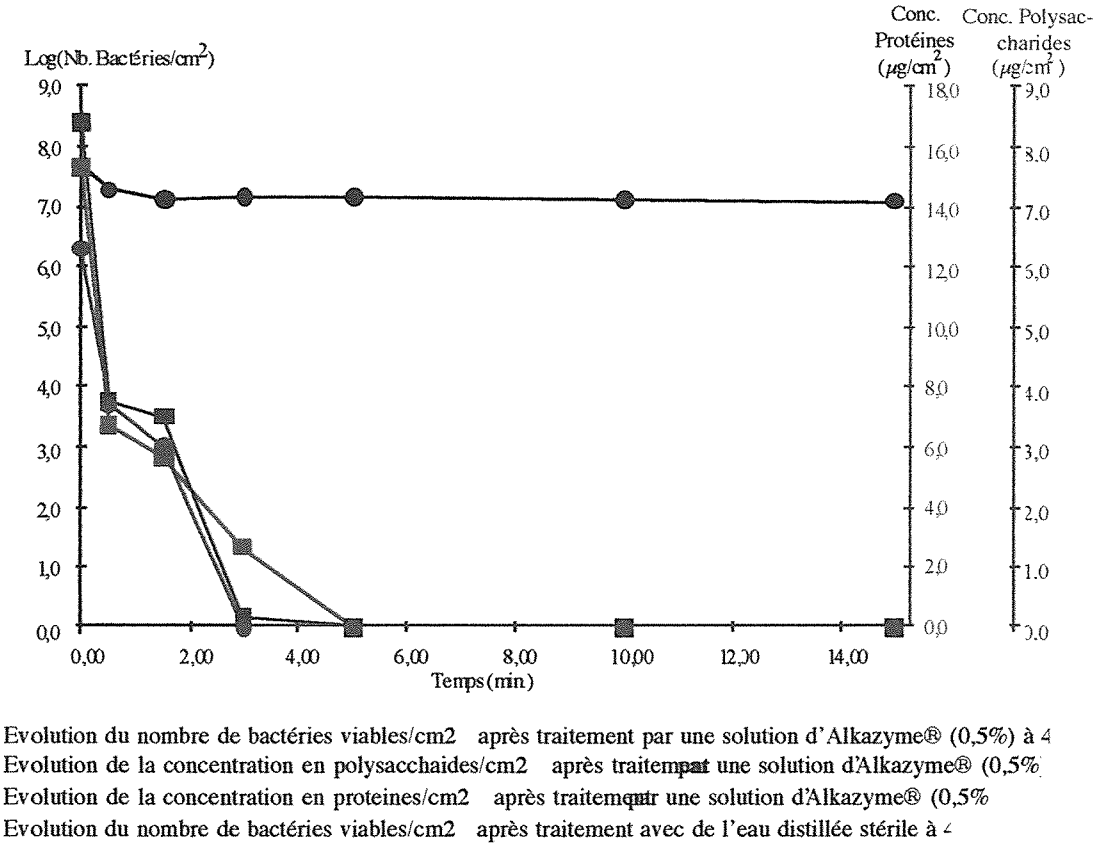


Figure 3 : Evolution du nombre de bactéries viables (log.) présentes au sein du biofilm et des concentrations en protéines et polysaccharides à la surface interne du tube Tygon® en fonction du temps de contact avec le produit Alkazyme® à 0,5% et 40°C et par rapport au témoin réalisé avec de l'eau distillée stérile à 40°C (E.D.S).

III-1 : Dénombrements bactériens :

Les résultats des dénombrements bactériens effectués sur la surface du tube Tygon® (Tableau 1 et figure 3) montrent qu'à 40°C :

- quel que soit le temps de contact, l'eau distillée stérile n'a qu'un très faible effet sur le nombre de bactérie adhérées au sein du biofilm. Le nombre de bactéries viables fixées sur la surface interne du tube tygon® passe de 4,57 10^7 à 1,28 10^7 après 1,5 minutes de contact puis se stabilise à environ 1,3 10^7 bactéries/cm^2. Cette légère diminution (0,5 unité logarithmique après 1,5 minutes) correspond à l'élimination des bactéries faiblement adhérées à la surface du biofilm.

- à 40°C Alkazyme® présente, une activité détachante notable dont les effets sur le biofilm sont visibles dès les 30 premières secondes de contact. Lors de cette première étape (30 secondes de contact), le nombre de bactéries viables encore présentes au sein du biofilm passe de 7,66 à 3,35 log. soit une réduction de 3,3 log par unité de surface. Toutefois, comme le montre la figure N°3, pour des temps de contact supérieurs à 30 secondes, la décroissance du nombre de bactéries adhérées au support est plus lente et l'élimination de la totalité des bactéries adhérées n'est obtenue que pour des temps de contact supérieurs ou égaux à 5 minutes.

III-2 : Dosage des protéines et des polysaccharides :

Les courbes tracant l'évolution des quantités résiduelles de protéines et de polysaccharides à la surface du support en fonction du temps de contact avec le produit Alkazyme® à 0,5% et 40°C présentent un profil comparable à celui obtenu pour la courbe traçant l'évolution du nombre de bactéries viables adhérées avec:

-une forte diminution (dès 30 secondes de contact) des quantités résiduelles de protéines et de polysaccharides à la surface du support, et
- après 5 minutes de contact, une quantité résiduelle de protéines et de polysaccharides qui devient inférieure à la valeur minimale détectable.

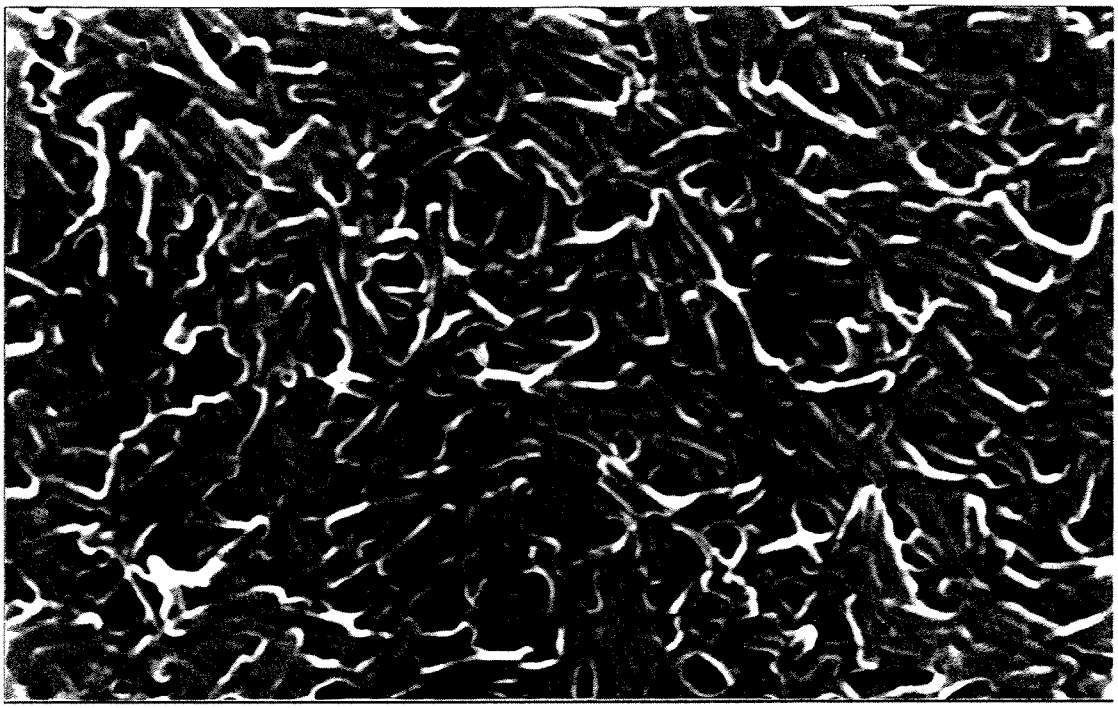
III-3 : Microscopie électronique à balayage :

L'analyse au microscope électronique à balayage des échantillons de tube Tygon® avant traitement (photo N°1) et après 30 secondes (photo N°2) ou 15 minutes (photo N°3) de contact avec le produit Alkazyme® à 0,5% et à 40°C a permis de mettre en évidence :

-une altération de la structure du biofilm (photo N° 2) dès 30 secondes de contact avec le produit alkazyme à 0,5% et à 40°C, accompagnée d'une diminution du nombre de bactéries présentent par unité de surface. Seules les bactéries des couches profondes du biofilm dont la morphologie est différente de celles des couches superficielles (Cf. biofilm témoin Photo N°1) persistent à la surface du support.

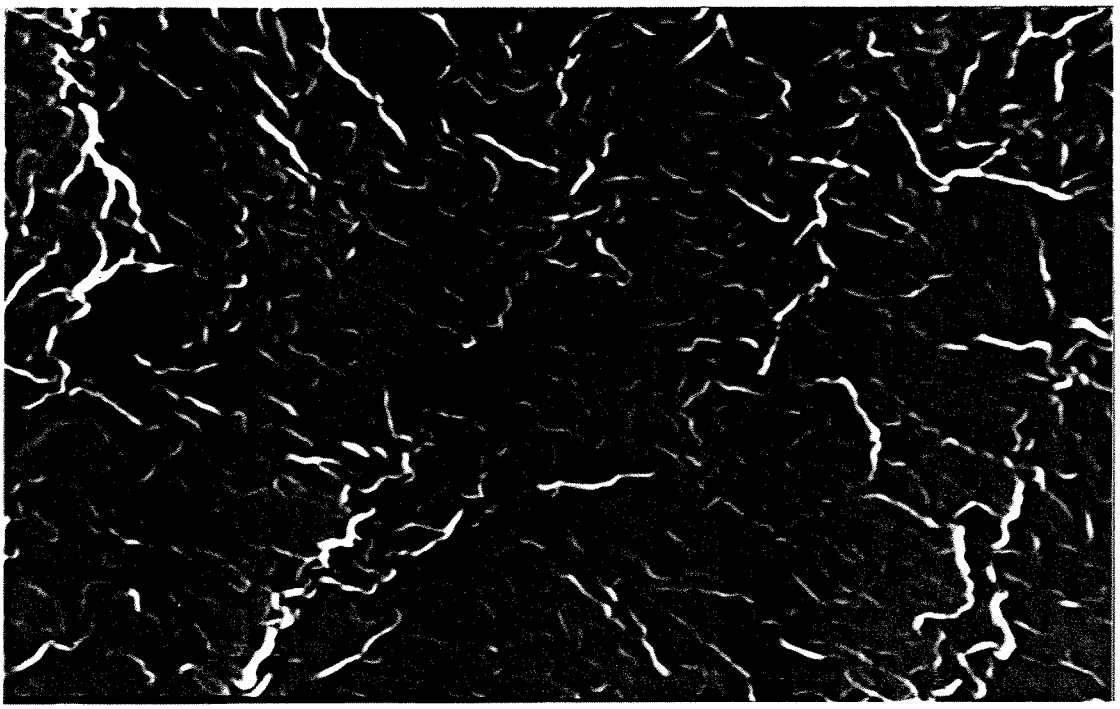
-une absence de structure bactérienne visible à la surface du support après 5 minutes de contact (Photo N°3).

Ces observations confirment les résultats obtenus précédement (dénombrements bactériens et dosages des protéines et polysaccharides) à savoir, l'absence de bactéries viables ou de résidu protéique et polysaccharidique à la surface du support pour des temps de contact supérieurs ou égaux à 5 minutes.



1 μm

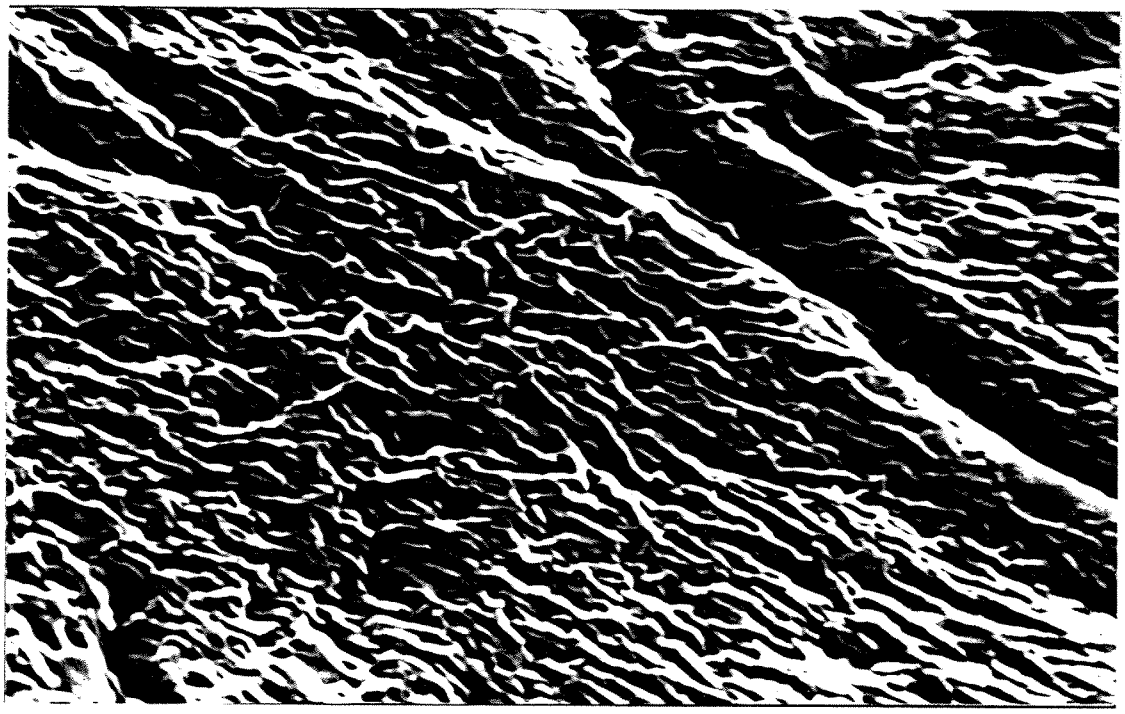
Photo N°1 : Observation au microscope électronique à balayage (X6000) de la portion de tube Tygon® témoin (avant traitement). Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* titrant 4,57 10^7 bactéries/cm^2.



1 μm

Photo N°2 : Observation au microscope électronique à balayage (X6000) de la portion de tube Tygon® après 30 secondes de traitement avec une solution d'Alkazyme® à 0,5% (40°C).

Laboratoire de Bactériologie, Virologie et Microbiologie Industrielle
35 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse Cedex 04
Tel : 05.62.25.68.60 Fax : 05.61.25.95.72



1 μm

Photo N°3 : Observation au microscope électronique à balayage (X6000) de la portion de tube Tygon® après 5 minutes& de traitement avec une solution d'Alkazyme® à 0,5% (40°C).

Laboratoire de Bactériologie, Virologie et Microbiologie Industrielle
35 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse Cedex 04
Tel : 05.62.25.68.60 Fax : 05.61.25.95.72

IV - CONCLUSIONS :

Les résultats des dénombrements bactériens et les dosages des quantités résiduelles de protéines ou polysaccharides à la surface du support, montrent qu'à 40°C une solution d' Alkazyme® à 0,5% entraîne :

dès 30 secondes de contact, une destructuration importante du biofilm associée à une réduction notable (3,3 log/cm^2) du nombre de bactéries adhérées à la surface du support, et

après 5 minutes de contact, une élimination totale du biofilm (bactéries, protéines et polysaccharides).

L'analyse des résultats présentés ci-dessus conforté par les observations au microscope électronique à balayage indique que dans les conditions expérimentales décrites, le produit Alkazyme® utilisé à 0,5% et à 40 °C pendant 5 minutes présente une très bonne activité détersive vis à vis d'un biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*

*****

Results of bacterial countings and protein / polysaccharide measurements indicate that a 0.5% Alkazyme® solution used at 40°C induces :

after a 30 seconds contact time, an important biofilm destructuration associated with a notable reduction of the stucked bacterial population (3,3 log/cm^2), and

for a 5 minutes or longer contact time, a total elimination of the biofilm (bacteria, proteins and polysaccharides).

The analysis of these results confirmed by the scanning electron microscopy, show that in those specific experimental conditions a 0.5% Alkazyme® solution used at 40°C for a 5 minutes contact time can be considered as an excellent detersive agent against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm.

Laboratoire de Bactériologie, Virologie et Microbiologie Industrielle
35 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse Cedex 04
Tel : 05.62.25.68.60 Fax : 05.61.25.95.72

INSTITUT DE RECHERCHE
MICROBIOLOGIQUE
SOUS ASSURANCE QUALITE

PROCES-VERBAL D'ESSAI

N° 153/0295

DELIVRE A : **ALKAPHARM**
30, avenue Amiral Lemonnier
78160 MARLY-LE-ROI

PRODUITS : **ALKAZYME (POUDRE)**

DEMANDE D'ESSAI DU : 14 février 1995

ANALYSE REFERENCE : 153/0295

ESSAI : Détermination de l'efficacité de nettoyage d'un bain d'ALKAZYME sur une suspension de spores bactériennes additionnée de sang.

Ce procès-verbal comporte 5 pages.

Date d'émission : 15 mai 1995

Emmanuelle HOCQUELOUX
Ingénieur Génie Biologique
Responsable des Essais

André CHANTEFORT
Docteur en Sciences Biologiques
Directeur

Rue Newton
Z.I. Mitry-Compans
F-77290 Mitry-Mory
Tél. (1) 64.27.64.27
Fax (1) 64.27.63.30
SARL au cap. de 200 000 F
R.C.Meaux B 351 422 183

I - IDENTIFICATION COMPLETE DES ECHANTILLONS

Nom du produit : **ALKAZYME (poudre blanche)**

Numéro de lot : 304081.3

Fabricant : ALKAPHARM
30, avenue Amiral Lemonnier
78160 MARLY-LE-ROI

Date de réception à l'I.R.M. : 14 février 1995

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

Période d'analyse : mars - avril 1995

II - CONDITIONS EXPERIMENTALES

1) PROTOCOLE D'ESSAI

- Une suspension contenant 2 x 10^7 spores / ml de spores de *Bacillus subtilis* CIP 5262 est préparée avec de l'eau disitllée stérile et diluée au demi dans du sang de mouton stérile.
- 200µl de la préparation sont déposés dans la lumière de deux tronçons d'un tuyau en plastique souple, transparent, de diamètre intérieur 3 mm et de longueur 5 cm.
- Les deux portions de tube sont ensuite placées 4 jours dans une enceinte ventilée thermostatée à 37°C afin de sécher les dépôts de spores bactériennes.
- Après séchage total, un des deux tubes est placé dans un tube à essai contenant 10 ml d'une solution d'ALKAZYME à 0,5 % (m/v) préparée 1h avant la manipulation dans de l'eau dure à trente degrés français ; l'autre tube est placé dans les mêmes conditions dans un bain témoin contenant 10 ml d'eau dure à trente degrés français.
- Après deux minutes de trempage, accompagnées d'une légère agitation pendant les 15 dernières secondes, les tubes sont retirés de leur bain et placés dans 2 tubes contenant 10 ml d'eau distillée stérile.

  Un dénombrement des spores en suspension, donc détachées, est réalisé sur les 2 bains de trempage par filtration sur membrane.

  Afin d'éliminer toute trace de produit sur les membranes, celles-ci sont rincées avec de l'eau distillée stérile additionnée de tween 80 à 0,5 % (v/v) à raison de 3 rinçages successifs de 50 ml.
- Pour dénombrer les spores non détachées des tubes, celles-ci sont remises en suspension par grattage à l'aide de l'extrémité d'une pipette Pasteur ainsi que par passage aux ultra-sons.

III - MATERIELS

Référence et nature des membranes :

* SARTORIUS 13 906 47 ACN, nitrate de cellulose, porosité 0,45 µm, blanches, quadrillées.

Liquide de lavage des membranes :

* nature : eau distillée additionnée de 0,5 % (v/v) de tween 80.
* mode de stérilisation : autoclavage à 121 °C pendant 25 minutes.
* nombre de lavages avec ce liquide : 3
* volume de liquide utilisé pour chaque lavage : 50 ml.

Milieux de dénombrement :

* Milieu pour "dénombrement des spores de *Bacillus*", norme AFNOR NF T 72-231 (août 1988)

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

Autres additions au milieu de dénombrement :

* 0,0025 % (p/v) de chlorure de triphényl tétrazolium, entraînant une coloration des colonies et permettant un meilleur dénombrement des spores survivantes.

IV - RESULTATS

	Tube essai trempé dans un bain d'ALKAZYME	Tube témoin trempé dans un bain d'eau dure
nombre de spores détachées en suspension dans le bain après 2 min de trempage	$9,15 \times 10^5$ (75,0 %)	$5,60 \times 10^5$ (47,1 %)
nombre de spores encore attachées dans la lumière du tube après trempage	$3,05 \times 10^5$ (25,0 %)	$6,30 \times 10^5$ (52,9 %)
Nombre total de spores dans les tubes, avant essai	**$1,22 \times 10^6$**	**$1,19 \times 10^6$**

V - CONCLUSIONS

Les résultats des dénombrements de spores réalisés à l'issue d'un trempage de 2 minutes de tubes plastique souples contaminés dans un bain d'ALKAZYME montrent que le produit ALKAZYME dilué à 0,5 % (m/v) dans de l'eau dure à trente degrés français permet un détachement plus important des spores de *Bacillus subtilis* préparées dans une gangue de sang séché.

Par rapport à l'action témoin de l'eau dure à trente degrés français utilisée seule, le produit ALKAZYME augmente le décrochage des spores de 60 %.

Lors des manipulations, l'examen visuel a permis de constater que dans le bain d'ALKAZYME, le détachement des spores se faisait rapidement et de façon homogène sur l'ensemble du dépôt, en donnant la nette impression d'un nettoyage plus efficace que dans le bain d'eau dure seule.

Laboratoire d'Hygiène Hospitalière
Faculté de Médecine
4, rue Kirschleger
67085 Strasbourg cedex

ETUDE : Biofilm 04- 004

Détermination de l'activité détersive du produit : Alkazyme ®

Rapport rédigé par : Estelle Zink
Externe en pharmacie

Rapport validé par : Nourredine Loukili
Interne en pharmacie

Approuvé par : Olivier Meunier
Praticien Hospitalier

1.Objectif de l'étude

Evaluer l'activité détersive du produit : Alkazyme® avec et sans enzyme, (Laboratoires Alkapharm) vis à vis d'un biofilm mono-bactérien formé dans des tubes à hémolyse en verre.

2.Matériel et Méthode

2.1. Matériel

a. Souche bactérienne

E. coli CIP 54127

b. Milieux de culture

Bouillon cœur cervelle pour la suite initiale de la souche d'*E. coli* 54127

Bouillon trypticase soja (Oxoïd) pour la formation du biofilm

c. Tubes à hémolyse stériles

d. Solution de cristal de violet 0.1% m/v

e. Di-méthylsulfoxyde

f. Spectrophotomètre UV-Visible

2.2 Méthode

Principe :

Après la fabrication d'un biofilm monobactérien sur une surface en verre, le biofilm est mis au contact de la solution détergente (ou l'eau pour les témoins positifs) selon les recommandations d'utilisation fournies par chaque fournisseur. Le biofilm est ensuite coloré par une solution de cristal de violet pendant 15 minutes. Enfin, le cristal de violet est extrait par du diméthylsulfoxide (DMSO) pour une lecture de la densité optique par un spectrophotomètre UV-Visible à 585 nm.

Mode opératoire :

1.75 ml bouillon TS contenus dans des tubes à hémolyse sont ensemencés par 0.250 ml d'une culture d'*E.coli* de 24 heures. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 48 heures. Le milieu de culture est renouvellé toutes les 24 heures pour maintenir les

bactéries en croissance exponentielle. Après 48 heures, les tubes sont vidés et le biofilm adhérent aux parois est mis au contact de la solution détergente préparée extemporanement (ou au contact de l'eau courante pour les témoins positifs) selon les recommandations d'utilisation du laboratoire Alkapharm. Après ce temps de contact, les tubes sont vidés et rincés avec de l'eau courante pour détacher les bactéries et/ou le biofilm faiblement adhérent à la surface. Une solution de cristal de violet 0.1% m/v est ensuite introduite pour colorer le biofilm résiduel sur la paroi du tube. Après 15 minutes de coloration, le cristal de violet est retiré et la coloration résiduelle des parois est extraite par 2 ml de DMSO. La densité optique de l'extrait est mesurée dans un spectrophotomètre UV-Visible à 585 nm. Pour chaque produit, les tests ont été réalisées sur un échantillon de 5 tubes à hémolyse.

3. Résultats

3.1. Courbe d'étalonnage

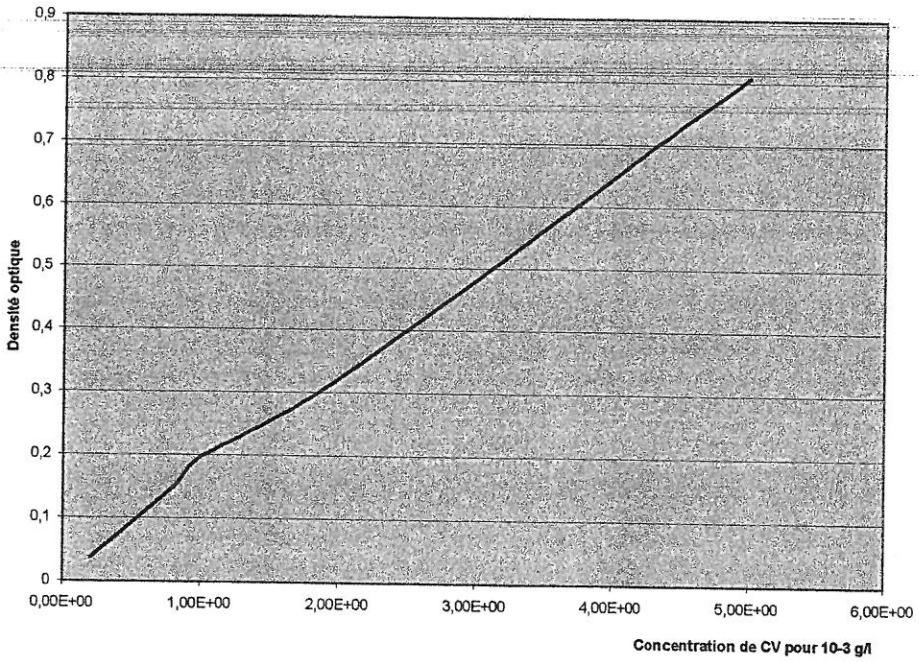


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de la solution de cristal de violet dans du DMSO

3.2. Résultats des moyennes des mesures du biofilm par spectrophotométrie

Produits	Moy. D.O.	ET. D.O.	actitivité détersive
Eau (réseau)	0.804	0.150	0%
Alkazyme ® enzyme +	0.088	0.036	89%
Alkazyme ® enzyme -	0.157	0.070	80%

Tableau 1 : moyennes des concentrations en biofilm après application des différentes solutions

Moy.: moyenne de 5 mesures
ET : écart type
D.O. : densité optique
% de détersion = $\frac{\text{D.O. moy. biofilm avec l'eau – D.O.. avec le produit X}}{\text{D.O. moy. biofilm avec l'eau}} * 100$

Les résultats de cette étude montrent que les produits Alkazyme® avec ou sans enzymes possèdent un pouvoir de détersion important (> 70%) comparable à d'autres produits testés dans notre laboratoire.

A l'aide de notre technique, simple et facile à mettre en oeuvre, nous avons testé d'autres détergents et détergents-désinfectants de plusieurs sociétés. Les résultats obtenus nous ont permis d'établir une classification de ces produits, en trois catégories, selon leur pourcentage de détersion :

- Pouvoir de détersion faible : pour les produits dont le pourcentage de détersion est compris entre 0% et 30%
- Pouvoir de détersion moyen : pour les produits dont le pourcentage de détersion est compris entre 30% et 60%.
- Pouvoir de détersion important : pour les produits dont le pourcentage de détersion est > 70%
- Les produits ayant une activité détersive négative ont été qualifiés comme des produits ayant des propriétés fixantes (exemple : le glutaraldéhyde).

5. Conclusion

Utilisé dans les conditions de concentration, de température et de temps préconisées par le laboratoire Alkapharm, Alkazyme® (avec ou sans enzyme) permet d'avoir une action détersive importante sur le biofilm d'*E.coli CIP 57124* produit dans des tubes à hémolyse en verre.

RAPPORT D'ESSAI
139-1REA10 CI1

Essai selon la norme NF EN 1040 (Avril 2006)

Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de base des antiseptiques et des désinfectants chimiques. Méthodes d'essai et prescriptions (Phase 1)

I. Identification de l'échantillon

Nom du produit :	**Alkazyme**
Numéro de lot :	2008.05.01.44
Fabricant :	ALKAPHARM Parc Biocitech - 102 avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE
Date de réception :	14/10/08
Conditions de stockage :	A température ambiante et à l'abri de la lumière
Diluant du produit recommandé par le fabricant :	Non précisé
Substance(s) active(s) :	Non précisé
Aspect du produit :	Poudre blanche

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

II. Principe de l'essai

L'essai selon la norme NF EN 1040 (2006) a pour but de mettre en évidence une réduction du nombre de microorganismes, lorsque ceux-ci sont mis au contact du produit à l'essai, dans les conditions spécifiées ci-dessous.

Cet essai réalisé en suspension permet de déterminer une activité bactéricide si le taux de réduction est de 10^5 ou plus.

III. Résultats d'essai

NF EN 1040 (2006)	**Alkazyme**	Lot : 2008.05.01.44

Période d'essai : 31/08/2010 au 3/09/2010

Diluant du produit : Eau distillée

Méthode par dilution –neutralisation

Neutralisant : Diluant Pharmacopée Européenne + Neutralisant (VWR)

Gélose de dénombrement : T.S.A.

Dénombrement en profondeur

Température d'essai : 20°C

Température d'incubation : 37°C

Microorganismes d'essai : *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467

Staphylococcus aureus CIP 4.83

Temps de contact additionnel: **15 minutes**

Aspect des dilutions du produit : Incolore

Stabilité des mélanges : Mélanges stables

a. Validation et témoins

Souche (Collection et numéro)	Suspension de validation (N_v)	Suspension de validation (N_{v0})	Témoin de conditions expérimentales (A)	Témoin du neutralisant (B)	Validation de la méthode (C)
Pseudomonas aeruginosa CIP 103467	1075	107,5	89	98	89
Staphylococcus aureus CIP 4.83	370	37	28,5	25,5	26

N_{v0} est compris entre 30 et 160 UFC/ml

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

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

b. Suspension d'essai

Souche (Collection et numéro)	Suspension d'essai (N)	lg N	N_0 (= N / 10)	lg N_0
Pseudomonas aeruginosa CIP 103467	$4,3 \times 10^8$	8,6	$4,3 \times 10^7$	7,6
Staphylococcus aureus CIP 4.83	$1,6 \times 10^8$	8,2	$1,6 \times 10^7$	7,2

N est compris entre $1,5 \times 10^8$ et $5,0 \times 10^8$ UFC/ml

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

c. Essai

		Nombre de cellules viables (Na) et taux de réduction (R) aux concentrations de produit testées		
Souche (Collection et numéro)		0,01%(v/v)	0,1%(v/v)	0,5%(v/v)
Pseudomonas aeruginosa CIP 103467	Na	>3300	<140	<140
	lg Na	>3,5	<2,2	<2,2
	lg R	**<4,1**	**>5,4**	**>5,4**
Staphylococcus aureus CIP 4.83	Na	>3300	<140	<140
	lg Na	>3,5	<2,2	<2,2
	lg R	**<3,7**	**>5,0**	**>5,0**

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

Une concentration est bactéricide si $lgR \geq 5$

IV. Conclusion

Le produit **Alkazyme, lot 2008.05.01.44**, est conforme à la norme NF EN 1040. Il présente une activité bactéricide à 20°C et en 15 minutes de contact.

Romainville, le 23 septembre 2010

Corinne BENOLIEL
Docteur en pharmacie
Directrice scientifique

KEYBIO
La maîtrise du risque microbiologique

Aubagne, le 29 juin 2005

Détermination de l'activité bactéricide d'un désinfectant chimique pour les instruments utilisés en médecine selon la norme NF EN 13727 (juillet 2004) - Conditions de saleté -

Rapport d'essais n° C 05-0560c

Ce rapport annule et remplace le rapport C05-0560. Erreur dans le tableau de résultats P3/5.

1 – Identification du Demandeur d'Essai

- **ALKAPHARM**
  30 avenue Amiral Lemmonier
  78160 Marly le Roi

  Tél. : 01.39.16.60.55
  Fax : 01.39.16.60.66

2 – Identification du Laboratoire d'Essai

- **LABORATOIRE KEYBIO**
  Z.I. Les Paluds 2
  Pôle Performance Bt C2
  B.P. n° 1427
  13785 AUBAGNE cedex

  Tél. : 04.42.84.29.00
  Fax : 04.42.84.28.84

Ce rapport d'essais ne concerne que les produits soumis à essais.
La reproduction de ce document n'est autorisée que sous la forme de fac-similé photographique intégral. Il comporte 5 pages et 0 annexe.

cofrac ESSAIS ACCRÉDITATION N° 1-0870 PORTÉE COMMUNIQUÉE SUR DEMANDE

Laboratoire en conformité B.P.L.
Décret n° 93-1312 du 31/12/98

Z.I. Les Paluds - Pôle Performance - BT C2 - BP 1427 - 13785 AUBAGNE Cedex
Tél. : 33 (4) 42 84 29 00 - Fax : 33 (4) 42 84 28 84 - keybio@keybio.com - www.keybio.com
S.A.R.L. au capital de 109 500 euros - RCB 384 238 523

3 – Identification du produit soumis à essai

- Nom du produit : Alkazyme- Détergent prédesinfectant protéolytique alcalin
- Numéro de lot : 2005 02 01 44 918
- Fabricant : non indiqué
- Date de réception : 27/04/05
- Conditions de stockage : température ambiante et obscurité
- Substance(s) active(s) : non indiqué
- Code Laboratoire : 4/524/3/0001/05
- Fiche de Demande D'essais n° : 05040503

4 – Conditions expérimentales

- Date des essais : du 20/05/05 au 27/06/05
- Concentrations du produit testées : 0,0625 – 0,125 – 0,25 – 0,5% (m/v)
- Diluant du produit utilisé au cours de l'essai : eau dure stérilisée 300 mg/Kg $CaCO_3$
- Apparence du produit et de ses dilutions : poudre blanche, dilutions translucides et fluides
- Méthode : dilution- neutralisation- Dénombrement en profondeur
- Neutralisant : saponine 30 g/l – histidine 1 g/l – tween 80 30 g/l – lécithine 50 g/l – solution tampon peptonée au chlorure de sodium 16,1 g/l.
- Substance interférente : mélange albumine bovine 3 g/l – érythrocytes de mouton 3 ml /l (conditions de saleté)
- Stabilité du mélange de la substance interférente et du produit soumis à l'essai dilué dans l'eau dure : précipité absent au cours de l'essai
- Temps de contact : 15 min. et 60 min ± 10 s
- Température d'essai : 20° C ± 1° C
- Température d'incubation : 36° C ± 1° C
- Souches d'essai :
    - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
    - *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
    - *Enterococcus hirae* ATCC 10541
- Personne responsable : F. THERY.

5 – Résultats d'essai

5 1– Résultats d'essai pour t = 15 min

SOUCHES D'ESSAI	Essai de Validation				Suspension bactérienne d'essai	Mode opératoire à la concentration du produit en % (m/v)				
	Suspension de validation	Témoin des conditions expérimentales	Témoin de neutralisation	Inactivation par dilution neutralisation			0,0625	0,125	0,25	0,5
P. aeruginosa ATCC 15442	Vc : 52; 54	Vc : 62; 58	Vc : 60; 50	Vc : 49; 55	10^{-6} : 185; 186	Vc		>330; >330	>330; >330	18; 20
	Nv : 530				10^{-7} : 33; 31	Na		> 3300	> 3300	190
	Nvo : 53	A : 60	B : 55	C : 52	N : $2,0.10^{8}$	Log Na		> 3,52	> 3,52	2,28
					No : $2,0.10^{7}$	Log R		**< 3,78**	**< 3,78**	**5,02**
S. aureus ATCC 6538	Vc : 80; 80	Vc : 89; 84	Vc : 67; 77	Vc : 87; 75	10^{-6} : 269; 285	Vc	>330; >330	85; 80	0; 0	0; 0
	Nv : 800				10^{-7} : 36; 44	Na	> 3300	825	< 140	< 140
	Nvo : 80	A : 87	B : 72	C : 81	N : $2,9.10^{8}$	Log Na	> 3,52	2,92	< 2,15	< 2,15
					No : $2,9.10^{7}$	Log R	**< 3,94**	**4,55**	**> 5,32**	**> 5,32**
E. hirae ATCC 10541	Vc : 79; 63	Vc : 89; 90	Vc : 84; 87	Vc : 66; 79	10^{-6} : 249; 233	Vc	>330; >330	>330; >330	0; 0	0; 0
	Nv : 710				10^{-7} : 29; 32	Na	> 3300	> 3300	< 140	< 140
	Nvo : 71	A : 90	B : 86	C : 73	N : $2,5.10^{8}$	Log Na	> 3,52	> 3,52	< 2,15	< 2,15
					No : $2,5.10^{7}$	Log R	**< 3,88**	**< 3,88**	**> 5,25**	**> 5,25**

Vc : Nombre de colonies comptées sur les boîtes
N : Nombre d'UFC/ml de la suspension bactérienne d'essai
Nv : Nombre d'UFC/ml de la suspension bactérienne
Na : Nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai
R : Réduction du nombre de cellules viables
A : Nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation des conditions expérimentales
B : Nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation de la non-toxicité du neutralisant
C : Nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation de l'inactivation par dilution - neutralisation

Conditions de validité :
N compris entre $1,5.10^{8}$ et 5.10^{8} ufc/ml–No compris entre $1,5.10^{7}$ et 5.10^{7} ufc/ml
Nv compris entre 3.10^{2} et $1,6.10^{3}$-Nvo compris entre 30 et 160 ufc/ml
A, B, C sont supérieurs ou égaux à 0,5 Nvo

5 2– Résultats d'essai pour t = 60 min

SOUCHES D'ESSAI	Essai de Validation				Suspension bactérienne d'essai	Mode opératoire à la concentration du produit en % (v/v)				
	Suspension de validation	Témoin des conditions expérimentales	Témoin de neutralisation	Inactivation par dilution neutralisation			0,0625	0,125	0,25	0,5
P. aeruginosa ATCC 15442	Vc : 53; 55	Vc : 68; 69	Vc : 56; 60	Vc : 57; 70	10^{-6} : 210; 223	Vc		>330; >330	>330; >330	0; 0
	Nv : 540				10^{-7} : 25; 32	Na		> 3300	> 3300	< 140
	Nvo : 54	A : 69	B : 58	C : 64	N : $2,3.10^{8}$	Log Na		> 3,52	> 3,52	< 2,15
					No : $2,3.10^{7}$	Log R		**< 3,84**	**< 3,84**	**> 5,22**
S. aureus ATCC 6538	Vc : 80; 80	Vc : 70; 69	Vc : 67; 77	Vc : 88; 74	10^{-6} : 269; 285	Vc	>330; >330	0; 0	0; 0	0; 0
	Nv : 800				10^{-7} : 36; 44	Na	> 3300	< 140	< 140	< 140
	Nvo : 80	A : 70	B : 72	C : 81	N : $2,9.10^{8}$	Log Na	> 3,52	< 2,15	< 2,15	< 2,15
					No : $2,3.10^{7}$	Log R	**< 3,94**	**> 5,32**	**> 5,32**	**> 5,32**
E. hirae ATCC 10541	Vc : 79; 63	Vc : 86; 76	Vc : 84; 87	Vc : 110; 114	10^{-6} : 249; 233	Vc	>330; >330	>330; >330	0; 0	0; 0
	Nv : 710				10^{-7} : 29; 32	Na	> 3300	> 3300	< 140	< 140
	Nvo : 71	A : 81	B : 86	C : 112	N : $2,5.10^{8}$	Log Na	> 3,52	> 3,52	< 2,15	< 2,15
					No : $2,5.10^{7}$	Log R	**< 3,88**	**< 3,88**	**> 5,25**	**> 5,25**

Vc : Nombre de colonies comptées sur les boîtes
N : Nombre d'UFC/ml de la suspension bactérienne d'essai
Nv : Nombre d'UFC/ml de la suspension bactérienne
Na : Nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai
R : Réduction du nombre de cellules viables
A : Nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation des conditions expérimentales
B : Nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation de la non-toxicité du neutralisant
C : Nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation de l'inactivation par dilution - neutralisation

Conditions de validité :
N compris entre $1,5.10^{8}$ et 5.10^{8} ufc/ml—No compris entre $1,5.10^{7}$ et 5.10^{7} ufc/ml
Nv compris entre 3.10^{2} et $1,6.10^{3}$-Nvo compris entre 30 et 160 ufc/ml
A, B, C sont supérieurs ou égaux à 0,5 Nvo

6 – Conclusion

Selon la méthodologie décrite dans la norme EN 13727 (juillet 2004), et dans les conditions de l'essai, le lot 2005 02 01 44 918 du produit .Alkazyme Détergent prédesinfectant protéolytique alcalin présente une activité bactéricide en 15 min. et en 60 min à 20° C dans les conditions de saleté (mélange albumine bovine 3 g/l – érythrocytes de mouton) lorsqu'il est dilué à 0,5% (m/v) dans l'eau dure vis-à-vis des souches de référence de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus hirae*.

F. THERY
Responsable des Essais

Docteur C. LENS
Responsable Assurance Qualité

RAPPORT D'ESSAI
015-1 REA 11

Essai selon la norme NF EN 13727 (Juillet 2004)

Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide des désinfectants chimiques pour les instruments utilisés en médecine Méthodes d'essai et exigences (Phase 2, Etape 1)

Essai partiel réalisé sur la souche *Acinetobacter baumannii*

I. Identification de l'échantillon

Nom du produit :	**Alkazyme**
Numéro de lot :	2009.08.01.44
Fabricant :	ALKAPHARM Parc Biocitech – 102 Avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE
Date de réception :	02/03/2011
Conditions de stockage :	A température ambiante
Diluant du produit recommandé par le fabricant :	Non précisé
Substance(s) active(s) :	Non précisée
Aspect du produit :	Poudre blanche

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

II. Principe de l'essai

L'essai selon la norme NF EN 13727 (2004) a pour but de mettre en évidence une réduction du nombre de microorganismes, lorsque ceux-ci sont mis au contact du produit à l'essai, dans les conditions spécifiées ci-dessous.

Cet essai réalisé en suspension permet de déterminer une activité bactéricide dans le domaine d'application, si le taux de réduction est de 10^5 ou plus.

III. Résultats d'essai

NF EN 13727 (2004)	**Alkazyme**	Lot : 2009.08.01.44

Période d'essai :	02/03/2011 au 14/03/2011
Diluant du produit :	Eau dure à 375 mg/kg de $CaCO_3$
Méthode par dilution –neutralisation	
Neutralisant :	Diluant Pharmacopée Européenne + Neutralisant (VWR)
Dénombrement en profondeur	
Gélose de dénombrement :	T.S.A.
Souche testée :	*Acinetobacter baumannii* CIP 103572
Température d'essai :	20°C
Température d'incubation :	37°C
Substances interférentes :	**Conditions de saleté** (albumine bovine 3g/l + érythrocytes de mouton 3ml/l)
Temps de contact additionnel:	**15 minutes**
Aspect des dilutions du produit :	Incolores
Stabilité des mélanges :	Mélanges stables

a. Validation et témoins

Souche (Collection et numéro)	Suspension de validation (N_{v0})	Témoin de conditions expérimentales (A)	Témoin de neutralisant (B)	Validation de la méthode (C)
Acinetobacter baumannii CIP 103572	97,5	66	86,5	87,5

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

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

b. Suspension d'essai

Souche (Collection et numéro)	Suspension d'essai (N)	lg N	N_0 (= N / 10)	lg N_0
Acinetobacter baumannii CIP 103572	$3,5 \times 10^8$	8,5	$3,5 \times 10^7$	7,5

c. Essai

		Nombre de cellules viables (Na) et taux de réduction (R) aux concentrations de produit testées		
Souche (Collection et numéro)		0,05% (v/v)	0,1% (v/v)	0,5% (v/v)
Acinetobacter baumannii CIP 103572	Na	>3300	>3300	340
	lg Na	>3,5	>3,5	2,5
	lg R	**<4,0**	**<4,0**	**5,0**

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

Une concentration est bactéricide si $lgR \geq 5$

IV. Conclusion

Le produit **Alkazyme, lot 2009.08.01.44,** est conforme à la norme EN 13727. Il présente une activité bactéricide sur la souche *Acinetobacter baumannii* en conditions de saleté, à 20°C et en 15 minutes de contact, à la concentration 0,5% (v/v).

Romainville, le 14 mars 2011

Corinne BENOLIEL
Docteur en pharmacie
Directrice scientifique

EVALUATION OF THE BACTERICIDAL ACTIVITY OF ALKAZYME USING A QUANTITATIVE HARD SURFACE CARRIER TEST

Syed A. Sattar, Ph.D.

Professor

Department of Microbiology & Immunology
Faculty of Medicine, University of Ottawa
451 Smyth Road, Ottawa, Ontario, Canada
K1H 8M5

Phone - (613) 562-5800 Extension 8314

Fax - (613) 562-5452

(This evaluation was conducted with the technical assistance of Sherilyn Bruder)

December, 1995

TABLE OF CONTENTS

	Page No.
A. **Summary**	3
B. **Introduction**	3
1. The Carrier Test	3
2. The Product Tested	4
C. **Materials and Methods**	4
1. The Test Bacteria	4
2. Phosphate Buffer	5
3. Hard Water	5
4. Test Product Preparation	5
5. TSA plates	5
6. Carrier Inoculation	5
7. The Carrier Test	5
D. **Results**	5
E. **Discussion and Concluding Remarks**	6
F. **Literature Cited**	6
G. **Acknowledgments**	6
Appendix A Preparation of *P. aeruginosa* suspension	9
Appendix B Preparation of *S. aureus* suspension	9
Appendix C Preparation of *S. choleraesuis* suspension	10
Appendix D Inoculation of Carriers for Quantitative Carrier Testing	10
Appendix E Quantitative Carrier Test	11

A. SUMMARY

Alkazyme, the product evaluated in this study, is meant for use as a 0.5% solution and it consists of a mixture of a quaternary ammonium compound, a non-ionic surfactant, a proteolytic enzyme and a corrosion inhibitor. It is designed for the precleaning of semi-critical medical devices such as flexible endoscopes. The instruments to be treated are soaked in the solution for 15 minutes at room temperature. The bactericidal effectiveness of three separate lots of this product was tested against *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), and *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), using a quantitative hard surface carrier test. Bovine serum, at a final concentration of 5%, was used as the organic load and the use-dilution of the product was prepared with standard hard water (200 ppm) as the diluent.

In all tests, the product was able to reduce the viability titre (as colony forming units) of the three test bacteria by at least 5 $\log_{10}$. Whereas there is no universally accepted criterion for $\log_{10}$ reductions to judge the bactericidal effectiveness of a product in a quantitative carrier test, we regard a 4 $\log_{10}$ to 6 $\log_{10}$ loss in the titre of all three test bacteria, after exposure to the product, as an indication of good bactericidal activity. Alkazyme meets this criterion under the test conditions of our study.

B. INTRODUCTION

1. ***The Carrier Test:*** The quantitative carrier test used in this study is a recently developed method to assess the bactericidal activity of liquid chemical germicides. The inside bottom surface of 20 mL glass vials is used as the carrier surface. The test involves drying a microbial suspension (10 µL), with or without an organic load, on a hard surface carrier and covering the dried inoculum with the use-dilution of the disinfectant (1 mL) for a specified contact time at the desired temperature. Control carriers receive a buffered solution in place of the product under test. At the end of the contact period, a diluent/neutralizer is added to arrest the activity of the product and to recover the test organism from the carrier surface. The eluates from test and control carriers are then passed through a membrane filter (0.2 µm pore diameter) and each filter is thoroughly rinsed with sterile phosphate buffer. The filters are then placed on plates of a suitable recovery medium and incubated at 37°C. The plates are examined for bacterial colonies daily for a total of 5 days. Results are reported as $\log_{10}$ reductions taking the titre of the test organisms in the control carriers as the baseline. Three separate batches of test product are evaluated and each test

is repeated at least three times to ensure the reproducibility of the results.

At least 10 test carriers and 3 control carriers are used in each test. The test has been designed to: (a) permit the determination of the exact number of colony forming units (CFU) placed on each carrier and the CFU remaining after the drying of the inoculum, (b) avoid washoff of any cells of the test organism, (c) allow complete recovery of the inoculum from the carrier surface, (d) arrest the test product's activity by dilution immediately at the end of the contact time, (e) capture all the cells of the test organism on a membrane filter before and after exposure to the test product, (f) removal of any residual germicidal activity by a thorough rinsing of the membrane filter, (g) allow a ratio of 1:100 between the volume of the test microbial inoculum and the volume of the product being evaluated, (h) incorporation of glass inserts to eliminate any false-positive results due to the generation of micro-aerosols in the carriers and (i) give a precise determination of $\log_{10}$ reduction in CFU of the test organism after exposure to the product under test. This new test method, therefore, eliminates the deficiencies associated with the AOAC Use-Dilution Test (AOAC, 1990) while meeting the Canadian General Standards Board's requirements for germicide test methodology (CGSB, 1991).

The carrier method used in this study has been subjected to round-robin testing and it is planned to submit it soon to the AOAC for consideration as a standard.

2. ***The Product Tested:*** According to the information supplied by the sponsor of this study, Alkazyme consists of a mixture of a quaternary ammonium compound, a non-ionic surfactant, a proteolytic enzyme and a corrosion inhibitor. It is designed for the precleaning of semi-critical medical devices such as flexible endoscopes. A 0.5% (w/v) solution of the product is prepared by dissolving 0.5 g of the powdered stock in 100 mL of 200 ppm hard water. The solution is to be held for 20-30 minutes at room temperature prior to use. The instruments to be treated are soaked in the solution for 15 minutes at room temperature.

C. MATERIALS AND METHODS

1. Test Bacteria: The bactericidal effectiveness of 3 lots of this product was tested against *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) using a quantitative carrier test. The details on how the test bacteria were cultured and how their test inocula were prepared are given in Appendices A-C.

2. Phosphate Buffer: The diluent and rinse used was phosphate buffer (pH 7.2).

3. Hard Water: Standard hard water (AOAC, 1990), containing 200 ppm as $CaCO_3$, was used as the diluent for the test product.

4. Test Product Preparation: Three separate lots of the product were sent to us by courier from France on June 26, 1995, by the manufacturer and the material was received here on July 4, 1995. The shipment contained three wide-mouth plastic boxes with screw caps. The product itself was in the form of a granular white powder. In our laboratory, the product was stored in the original containers at room temperature in a manner where only authorized personnel had access to it. As per the manufacturer's instructions, the in-use dilution of the product was prepared at a 0.5% concentration by dissolving 0.5 g in 100 mL of 200 ppm hard water. A time period of 30 minutes was allowed between preparation and testing of the product.

5. Tryp-Soy Agar (TSA) Plates: TSA in 100 mm diameter disposable plastic plates was used as the growth medium for all three organisms. The medium was purchased from Difco Laboratories (Detroit, Michigan) and the culture plates were prepared according to the manufacturer's instructions.

6. Carrier Inoculation: Carrier inoculation involved placing 10 µL of the test microbial suspension at the centre of the inside bottom surface of the glass carrier. The inoculum was dried by keeping the inoculated carriers for one hour in a desiccator. The titre of the test bacterium in the suspension was adjusted to assure the presence of no less than 10^6 CFU/carrier after the drying of the inoculum. Whereas no concentration of the cultures of *P. aeruginosa* and *S. aureus* was required to achieve this, *S. choleraesuis* needed a 15-fold concentration by centrifugation to compensate for the higher losses of its infectivity during the drying of the inoculum on the carriers. The method for the preparation of the carriers is given in Appendix D.

7. The Carrier Test: The Quantitative Carrier Test involves placing the use-dilution of the disinfectant onto test carriers for the appropriate contact time, diluting where necessary, filtering, rinsing, placing filters onto an agar medium for the recovery of the test organisms, monitoring recovery for 5 days and determining $\log_{10}$ reductions. This procedure is described in Appendix E.

D. RESULTS

Each lot of the product was tested at least three times with each one of the three test bacteria. The results as $\log_{10}$ reductions in the colony forming units of *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *S. choleraesuis* are summarized in Tables 1, 2 and 3, respectively. All three lots of the product were

able to reduce the viability titre of the three bacteria by at least 5 $\log_{10}$ in each test under the experimental conditions of this study. It should also be noted here that the test inoculum contained an organic load as represented by 5% bovine serum, and the test product was diluted in standard hard water (200 ppm) to prepare the test solution. These findings show that Alkazyme has strong activity against the three types of vegetative bacteria tested. Whereas there is no universally accepted criterion for $\log_{10}$ reductions to judge the bactericidal effectiveness of a product in a quantitative carrier test, we regard a 4 $\log_{10}$ to 6 $\log_{10}$ loss in the viability titre of the test bacteria after exposure to the product as an indication of good bactericidal activity. Alkazyme meets this criterion under the test conditions of our study.

D. DISCUSSION AND CONCLUDING REMARKS

The study used a fully quantitative hard surface carrier test to determine the bactericidal activity of Alkazyme, a product designed for the pre-cleaning of medical devices such as flexible endoscopes. All three lots of the product were able to reduce the viability titre of the test bacteria by at least 5 $\log_{10}$. In fact, the reduction in the titre of *S. aureus* and *S. choleraesuis* in all the tests was no less than 6 $\log_{10}$. *P. aeruginosa* was somewhat less senstitive to the product in that in three of the nine tests (Table 1) its $\log_{10}$ reduction was a little less than 6 $\log_{10}$, but always equal to or higher than 5 $\log_{10}$. A 5 $\log_{10}$ still represents a 9.9999% drop in viability titre.

The procedure, as reported here, met the testing requirements of the Canadian General Standards Board (1990) except that it used the flat surface of a glass vial instead of penicylinders.

F. LITERATURE CITED

AOAC (1990). *Official Methods of Analysis of the AOAC*. AOAC, Washington, D.C.

Canadian General Standards Board (1991). *Assessment of Efficacy of Antimicrobial Agents for Use on Environmental Surfaces and Medical Devices*. Document #CAN/CGSB-2.161-M91. CGSB, Ottawa, Canada.

G. ACKNOWLEDGMENTS

I am grateful to Ms. Sherilyn Bruder for her excellent technical assistance and for the timely completion of this study. The help provided by Mr. Gilles Morier of our university's Research Services was most valuable in the contractual aspects of this investigation.

Table 1. The germicidal activity of Alkazyme against *Pseudomonas aeruginosa*

Lot Number	Expt	Date of Expt.	Average CFU/Control Carrier	Average CFU/Test Carrier	Log_{10} Reduction in CFU
404181	1	20 Oct., 1995	4.6×10^6	47	5.1
"	2	22 Oct., 1995	1.7×10^6	0	6.2
"	3	25 Oct., 1995	1.0×10^6	1	6.0
301191	1	16 Oct., 1995	4.2×10^6	49	5.0
"	2	22 Oct., 1995	1.7×10^6	1	6.2
"	3	25 Oct., 1995	1.0×10^6	9	5.0
504121	1	21 Oct., 1995	1.2×10^6	1.2	6.0
"	2	22 Oct., 1995	1.7×10^6	0	6.2
"	3	25 Oct., 1995	1.0×10^6	0	6.0

Table 2. The germicidal activity of Alkazyme against *Staphylococcus aureus*

Lot Number	Expt.	Date of Expt.	Average CFU/Control Carrier	Average CFU/Test Carrier	Log_{10} Reduction in CFU
404181	1	03 Sept., 1995	1.6×10^7	0	7.2
"	2	04 Oct., 1995	1.2×10^7	0	7.1
"	3	15 Oct., 1995	1.0×10^7	0	7.0
301191	1	03 Sept., 1995	1.6×10^7	0	7.2
"	2	04 Oct., 1995	1.2×10^7	0	7.1
"	3	14 Oct., 1995	1.1×10^7	0	7.0
504121	1	03 Sept., 1995	1.6×10^7	0	7.2
"	2	04 Oct., 1995	1.2×10^7	0	7.1
"	3	15 Oct., 1995	1.0×10^7	0	7.0

S.A. Sattar

Table 3. The germicidal activity of Alkazyme against *Salmonella choleraesuis*

Lot Number	Expt.	Date of Expt.	Average CFU/Control Carrier	Average CFU/Test Carrier	Log_{10} Reduction in CFU
404181	1	06 Nov., 1995	4.9×10^6	0	6.7
"	2	11 Nov., 1995	7.1×10^6	0	6.8
"	3	25 Nov., 1995	1.1×10^7	0	7.0
301191	1	06 Nov., 1995	4.9×10^6	0	6.7
"	2	6 Nov., 1995	4.9×10^6	0	6.7
"	3	22 Nov., 1995	7.6×10^6	0	6.9
504121	1	06 Nov., 1995	4.9×10^6	0	6.7
"	2	14 Nov., 1995	1.1×10^7	0	7.0
"	3	22 Nov., 1995	7.6×10^6	0	6.9

Alkazyme

S.A. Sattar

APPENDIX A

Preparation of *Staphylococcus aureus* culture

Objective: To grow a bacterial culture to be used for quantitative carrier testing.

Materials: *S. aureus* frozen stock ATCC 6538
Bovine Serum, Tryp-Soy Broth, Tryp-Soy Agar, 37°C incubator, 250 mL Erlenmeyer flask 100 µL pipette, 25 mL test tubes

Method: This method prepares 100 mL of culture medium but requires only 10 mL for each culture grown. The remaining may be refrigerated for future use.

1) Prepare 100 mL of Tryp-Soy Broth as per manufacturer's instructions and distribute 5 - 10 mL aliquots into appropriate number of test tubes. Autoclave sterilize as per manufacturer's instructions.
2) Inoculate a test tube of broth with 100 µL of thawed stock culture.
3) Incubate for 24 hours at 37°C.
4) Determine the total count by spread plate enumeration. Note: This should produce approximately 10^9 CFU/mL.
5) Add bovine serum to the bacterial culture to yield a final concentration of 5%.

APPENDIX B

Preparation of *Pseudomonas aeruginosa* culture

Objective: To grow a bacterial culture to be used for quantitative carrier testing.

Materials: *P. aeruginosa* frozen stock ATCC 15442
Bovine Serum, Tryp-Soy Broth, Tryp-Soy Agar, 37°C incubator, 250 mL Erlenmeyer flask, 100 µL pipette, 25 mL test tubes

Method: This method prepares 100 mL of culture medium but requires only 10 mL for each culture grown. The remaining may be refrigerated for future use.

1) Prepare 100 mL of Tryp-Soy Broth as per manufacturer's instructions and distribute 5 - 10 mL aliquots into appropriate number of test tubes. Autoclave sterilize as per manufacturer's instructions.
2) Inoculate a test tube of broth with 100 µL of thawed stock culture.
3) Incubate for 24 hours at 37°C.
4) Determine the total count by spread plate enumeration. Note: This should produce approximately 10^9 CFU/mL.
5) Add bovine serum to the bacterial culture to yield a final concentration of 5%.

APPENDIX C

Preparation of *Salmonella choleraesuis* culture

Objective: To grow a bacterial culture to be used for quantitative carrier testing.

Materials: *S. choleraesuis* frozen stock ATCC 10708
Bovine Serum, Tryp-Soy Broth, Tryp-Soy Agar, 37°C incubator, 250 mL Erlenmeyer flask, 100 µL pipette

Method:
1) Prepare 150 mL of Tryp-Soy Broth as per manufacturer's instructions. Autoclave sterilize as per manufacturer's instructions.
2) Inoculate broth with 100 µL of thawed stock culture.
3) Incubate for 24 hours at 37°C.
4) Centrifuge culture at 6000 rpm for 15 minutes.
5) Resuspend in 10 mL of TSB with 5% bovine serum.
4) Determine the total count by spread plate enumeration. Note: This should produce approximately 10^{11} CFU/mL.

APPENDIX D

Inoculation of Carriers for Quantitative Carrier Testing

Objective: To prepare inoculated carriers for use in quantitative carrier testing.

Materials: Glass carrier - flat bottomed 24 mm screw cap vials with black caps (Galaxy Environmental Products 5260-G, New Jersey, U.S.A.)
2) glass inserts (Galaxy Environmental Products), septate caps, bacterial suspension, Eppendorf pipette (0.5-10 µL), sterile latex gloves, desiccator

Carrier Preparation: Place clean glass inserts inside the vials and secure loosely with the septate caps. Place inside a covered autoclavable basket for sterilization. Place an equal number of normal caps in a covered container. Autoclave the carriers and caps and dry in a 60°C drying oven for at least 2 hours.

Method:
1. Wearing sterile gloves, tighten the septate caps on the carriers and place in a desiccator. Ensure the inserts are positioned in the centre of the vial bottoms. Care should be taken not to grind the insert on the bottom of the vial.
2. Vortex the test bacterial suspension to mix and pipette 10 µL into each carrier. Ensure that the inoculum does not touch the walls of the inserts.
3. Allow 1 hour for desiccator drying at room temperature.
4. Observe the dried inoculum on each carrier. Discard any carrier in which the inoculum has touched the wall of the insert.
5. Wearing sterile gloves, remove the inserts carefully and replace the septate caps with normal caps. These carriers are now ready for quantitative carrier testing.

Alkazyme

S.A. Sattar

APPENDIX E

Quantitative Carrier Test

Objective: To quantitatively determine the bactericidal efficacy of germicides.

Materials:
1) carriers inoculated with the test bacterial suspension
2) phosphate buffer pH 7.2 (PB); autoclave sterilized
3) test germicide prepared to give give the use-dilution
4) Millipore filtration units (47 mm)
5) 0.2 µm pore size (47 mm diameter) gridded membrane filters (sterile)
6) custom-built Teflon stir bars (autoclave sterilized)
7) plates (100 mm diameter) of the recovery medium
8) magnetic stir plate
9) magnet (must be strong enough to hold stir bar in place)

Method:

Controls

1) 1 mL of PB is added to each control carrier and held at desired temperature for the exposure time indicated by the manufacturer of the product under test.
2) The carriers are then eluted by vortexing and serially diluted to yield approximately 10^2 cfu/mL.
3) The final dilution is filtered and the filter is placed on the appropriate recovery medium for incubation at the appropriate temperature.
4) Plates are observed daily over a period of 5 days. Colonies are counted and the numbers averaged. Log_{10} reductions are determined by using the number of colonies recovered from the control carriers as the baseline.

Tests

1) One mL of test germicide is added to each test carrier and held at the desired temperature for the exposure time indicated by the manufacturer for the product under test.
2) Immediately at the end of the exposure time, 20 mL of PB is added to each carrier to dilute the product and arrest its activity. A Teflon stir bar is added and the carrier is placed on a magnetic stir plate. The stir bar is activated to remove the inoculum from the bottom of the carrier (approximately one minute or until the inoculum is completely removed).
3) Using a magnet to hold the stir bar inside the carrier, the contents are poured into and filtered through the Millipore filtration unit. The carrier vial is rinsed several times with PB. The rinses are also filtered through the unit. Finally, additional PB is used to wash down the sides of the filter unit onto the filter. Approximately 100 mL of PB is used in total for each carrier.
4) The filter is then placed onto the recovery medium and incubated under appropriate conditions. Plates are held a minimum of five days.
5) Colonies on each plate are counted and calculation of log_{10} reductions are made in relation to the numbers on the control carriers.

Alkazyme S.A. Sattar

13.DEC.95 17:02 P.12
Pg: 12

RAPPORT D'ESSAI
191-1 REA 10 AN

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

Determination of the bactericidal activity and the chelating power of ALKAZYME

Simulation of the practical conditions of use

I. Sample identification

Product name:	**ALKAZYME (conditionning on bucket)**
Batch number:	2008.05.01.44
Manufacturer:	ALKAPHARM Parc Biocitech - 102 avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE
Date of receipt:	14/10/2008
Storage conditions:	At ambient temperature and keep away from light
Product diluent recommended by the manufacturer:	Not specified
Active substance(s):	Not specified
Product appearance	White powder

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

II. Objective of the test

This essay is realized to test the chelatant power and the bactericidal activity of ALKAZYME product at a concentration of 0.5% in 15 minutes, with a simulation of practical conditions of use, in one bath of 5L of water of a measured hardness in presence of microorganisms and interfering substances according to a definite protocol.

It comes from protocols of defined tests for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants for instruments used in the medical area.

III. Test principle

The test will take place in two phases:

a. Preliminary tests

Volume of the tested bath: 10 ml

Following protocol was realized:

- Preparation of diluted product at 0.5% in hard water:
  - Preparation of hard water at 30°f
  - Exact measure of prepared water hardness
  - Preparation of ALKAZYME solution to obtain a concentration of 0.5%
  - Measure of water hardness after dissolution of ALKAZYME
- Preparation stainless steel support
  - Preparation of microorganism suspensions to test
  - Preparation of interfering substances
  - Deposit of the mixture composed with interfering substances and microorganisms, then drying at 37°C during maximum 1 hour
- Put in contact of supports with 10mL of a solution beforehand prepared ALKAZYME
- After a contact time of 15 minutes, incubation and counting of the survivors
- Measure of the water hardness
- Check of the bactericidal activity of the product

b. Simulation test for practical conditions of use

Volume of the tested bath: 5 liters

The protocol is similar, in the difference:

- Of the quantity of the tested bath: 5 liters
- Stainless steel support which will be carried in inclusion in the culture media to estimate the number of survivors

IV. Experimental conditions

	ALKAZYME	Batch : 2008.05.01.44

Test period: 09/11/2010 to 31/12/2010

Product diluent: Hard water at 375 mg/kg of $CaCO_3$

Measurement of hardness with kit « Total Hardness Test » of Merck (ref : 1.14652.0001)

Method of dilution –neutralization

Neutralising agent: Pharmacopoeia diluent + Neutralising agent (VWR)

In-depth count

Culture media: T.S.A.

Test temperature: 20°C

Incubation temperature: 37°C

Microorganisms test: *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467
Staphylococcus aureus CIP 4.83

Interfering substances:

- Dirty conditions (medical area) : (bovin albumin 0,3g/l + sheep erythrocytes 3ml/l) (SI 1)
- Sheep erythrocytes 3ml/l) (SI 2)

Carry microorganism: Stainless steel discs (304L) of 2cm and 4cm diameter

Number of supports tested:

- Preliminary test: 1 stainless steel disc (2 cm diameter) by test (interfering substance – microorganisms) with only 1 deposit
- Test in a volume of 5L: 5 stainless steel discs of 4 cm diameter for put 10 deposits on their surface

Drying time of the carries: 1h

Contact time: **15 minutes**

Product' dilution appearance : Colourless

Mix stability: Stable

V. Microbiological results

a. Validation and controls

Strain (Collection and number)		Bacterial suspension for validation (N_{v0})	Control of experimental conditions (A)	Control of experimental conditions (B)	Validation of the method (C)
Pseudomonas aeruginosa CIP 103467	Preliminary tests SI 1*	78	71,5	68	60
	Preliminary tests SI 2**	78	84,5	68	90,5
	Test in a volume of 5L SI 1*	125	96,5	101,5	108
	Test in a volume of 5L SI 2**	125	104,5	101,5	111,5
Staphylococcus aureus CIP 4.83	Preliminary tests SI 1*	55,5	57	61	68
	Preliminary tests SI 2**	55,5	58,5	61	81
	Test in a volume of 5L SI 1*	52	53	51,5	43,5
	Test in a volume of 5L SI 2**	52	52	51,5	50

* SI 1 (Interfering substances 1): Bovin albumin 0,3g/l + sheep erythrocytes 3ml/l

** SI 2 (Interfering substances 2): Sheep erythrocytes 3ml/l

Criteria for test validation:
N_{v0} is between 30 and 160 UFC/ml
A, B and C are greater than or equal to 0.5 x N_{v0}

The method is validated under test conditions

b. Test suspension

Strain (Collection and number)		Test suspension (N)	lg N	N_0 (= N / 10)	lg N_0
Pseudomonas aeruginosa CIP 103467	Preliminary tests SI 1* and SI 2**	$2,3\ 10^9$	9,4	$2,3.\ 10^8$	8,4
	Test in a volume of 5L SI 1* and SI 2**	$5\ 10^{10}$	10,7	$5\ 10^9$	9,7
Staphylococcus aureus CIP 4.83	Preliminary tests SI 1* and SI 2**	$1,9\ 10^9$	9.3	$1,9\ 10^8$	8,3
	Test in a volume of 5L SI 1* and SI 2**	$1,8\ 10^{10}$	10,3	$1,8\ 10^9$	9,3

* SI 1 (Interfering substances 1): Bovin albumin 0,3g/l + sheep erythrocytes 3ml/l

** SI 2 (Interfering substances 2): Sheep erythrocytes 3ml/l

c. Test

		Number of viable cells (Na) and reduction rate (R) in tested product concentrations			
Strain (Collection and number)		0,5% (v/v) Preliminary tests		0,5% (v/v) Test in a volume of 5L	
		SI 1 *	SI 2 **	SI 1 *	SI 2 **
Pseudomonas aeruginosa CIP 103467	Na	< 140	< 140	< 140	< 140
	lg Na	< 2.2	< 2.2	< 2.2	< 2.2
	lg R	**> 6,2**	**> 6,2**	**> 7,5**	**> 7,5**
Staphylococcus aureus CIP 4.83	Na	< 140	< 140	< 140	< 140
	lg Na	< 2,2	< 2,2	< 2,2	< 2,2
	lg R	**> 6,1**	**> 6,1**	**> 7,1**	**> 7,1**

* SI 1 (Interfering substances 1): Bovin albumin 0,3g/l + sheep erythrocytes 3ml/l

** SI 2 (Interfering substances 2): Sheep erythrocytes 3ml/l

lg R = lg N_0 - lg Na

- According to the European standards, a concentration is considered bactericidal if lgR ≥ 5
  In a bath of 5L, the logarithmic reduction obtained compared to the initial inoculum **is higher than 7 log for the two tested strains**.

- The support used for tests and carried in the culture media allowed to bring the light **the absence of surviving microorganisms on their surface.**

VI. Measurement of the water hardness

The hardness of the water was measured at different step of the protocol.

Results:

Step of the protocol	**Water hardness measured**	**Water qualification**
After preparation of hard water	34,2°f	Hard water
After introduction and dissolution of Alkazyme in the hard water	< 1,8°f	Soft water
15min after microorganims and interfering substances introduction in test solutions	< 1,8°f	Soft water

Criteria to qualifying the hardness water:

	Very soft	Soft	Moderately hard	Hard	Very hard	
Dureté en degré français (°f)	0	7	15	25	42	>42

Observation:

The chelatant power of ALKAZYME product is highlighted.

Calcium and magnesium ions (Ca^{2+} and Mg^{2+}) contained in hard water complex themselves with sequestering contained in the product and the water describe as "hard" is transformed into "soft".

VII. Conclusion

The product **ALKAZYME, batch 2008.05.01.44**, shows:

- A bactericidal activity higher than 7 log on the strains *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* according to the protocol of the test, with a contact time of 15 min, at 0.5% concentration, at 20°C and under interfering substances :
  - On tested carries (medical devices)
  - On effluents (disinfection bath)
- A chelatant power able to transform a water describe as "hard" into a water describe as "soft"

Romainville, December 21st, 2010

Corinne BENOLIEL
Pharmacist PhD
Scientific director

IRM
INSTITUT DE RECHERCHE MICROBIOLOGIQUE
(Microbiology Research Institute)
Quality assured

TEST REPORT

No 867/0294

SENT TO: **ALKAPHARM**
30, avenue Amiral Lemonnier
78160 MARLY-LE-ROI
France

PRODUCT: ALKAZYME

TEST REQUEST OF: 24 February 1994

ANALYSIS REFERENCE No: 867/0294

TEST: TO ASSESS THE BACTERICIDAL ACTION AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* OF A 0.5% SOLUTION OF A DISINFECTANT AFTER REPEATED SEEDING AND SUCCESSIVE ADDITIONS OF AN INTERFERING PROTEIN.

This report comprises 6 pages.

Date of issue: 9 March 1994

[signature]
Emmanuelle HOCQUELOUX
Biological engineer
Head of testing

[signature]
André CHANTEFORT
Doctor of Biological Science
Director

Rue Newton
Z.I. Mitry-Compans
F-77290 Mitry-Mory
France
Tel: +33 (0)1 64.27.64.27
Fax: +33 (0)1 64.27.63.30
Limited company with share capital of FRF 200 000
Company No B 351 422 183 on the Meaux Companies Register

Approved by the Ministry for Research and Technology
Accredited by *Réseau National D'Essais* (National Testing Network), accreditation No 101.91/01

I - FULL IDENTIFICATION OF THE SAMPLE

Name of product: **ALKAZYME**

* lot number: 02021

Manufacturer: ALKAPHARM
30, avenue Amiral Lemonnier
78160 MARLY-LE-ROI
France

Date of receipt by I.R.M: 24 February 1994.

Storage conditions: on the laboratory bench, at room temperature.

Analysis period: February–March 1994.

Active substances and concentrations: not stated.

Appearance of the product and product solution: water-soluble white powder.

II - TEST CONDITIONS

Dilution ratio of the test product: 0.5% (w/v).

Nature of solvent: hard water with 30 degrees total hardness (French degrees).

Bacteria strain:

Maintained and controlled under standard AFNOR T 72-140 (August 1988)

Pseudomonas Aeruginosa CIP A22

Test temperature: 20ºC± 1ºC.

Interfering substance: 0.3% (w/v) bovine albumin.

A. **TEST METHOD**

1. 0.3% (w/v) bovine albumin added to the product diluted in 30 degree TH hard water in the ratio 0.5% (w/v).

2. 0^6 per ml *Pseudomonas aeruginosa* bacteria seeded in the diluted product.

3. Bacteria surviving after 15 minutes' contact at 20ºC enumerated.

This experiment is repeated 5 times over a 2-day period.

Before each experiment, the bacteria surviving after the previous test are counted.

B - **BACTERIA ENUMERATION AND PRELIMINARY TESTS**

The bacteria enumeration is done either by embedding in a plate count agar gel medium (BIOKAR OBK 043), or by membrane filtration through white grid-marked membranes, with pore size 0.45 µm (MILLIPORE HAWG 047S1) and placing the membranes on the same gel medium with 0.0025% (w/v) OF 0.5% (V/V) TTC (triphenyltetrazolium chloride) added.

The number of surviving bacteria present in the product is counted by membrane filtration. The membranes are rinsed with 3 x 50ml sterile liquid made up of distilled water with 0.5% (v/v) TWEEN 80 added.

Preliminary tests are performed before each experiment. The preliminary tests consist in ascertaining that the method used for rinsing the filtration membranes eliminates all traces of product from the membranes. They are carried out by double-filtering 1ml of product to which the successive quantities of interfering substance have been added (but no bacteria) through filtration membranes, then rinsing the membranes according to the procedure described above. A calibrated suspension of *Pseudomonas aeruginosa* is then filtered through the membranes. The outcome of the preliminary tests is positive if the number of *Pseudomonas aeruginosa* colonies found on the filtration membranes treated in this way is close to the number of *Pseudomonas aeruginosa* colonies found on filtration membranes that have not been in contact with the product.

III - **RESULTS OF PRELIMINARY TESTS UNDER THE CONDITIONS DESCRIBED**

1 - **Day one**

Bovine albumin concentration in the 0.5% dilution ALKAZYME bath	Inoculum count by gel medium embedding	Inoculum count by membrane filtration	Preliminary test
0.3% (w/v) (1st addition)	163	220	178
0.6% (w/v) (2nd addition)	190	203	170
0.9% (w/v) (3rd addition)	197	201	198

2 - **Day two**

Bovine albumin concentration in the 0.5% dilution ALKAZYME bath	Inoculum count by gel medium embedding	Inoculum count by membrane filtration	Preliminary test
1.2% (w/v) (4th addition)	175	175	178
1.5% (w/v) (5th addition)	165	156	133

The outcome of the preliminary tests was positive for a 0.5% (v/v) concentration of the product **ALKAZYME**, with bovine albumin concentrations of 0.3% (w/v) to 1.5% (w/v).

IV **TEST PROPER**

1. **Day one**

Bovine albumin concentration in the 0.5% dilution ALKAZYME bath	Number of surviving bacteria before the test (per ml)	Number of bacteria at start of test (per ml)	Number of surviving bacteria after 15 minutes' contact with the product (per ml)	Log reduction after 15 minutes' contact	Log reduction between each test
0.3% (w/v) (1st addition)	-	2.2×10^6	227	4.0	-
0.6% (w/v) (2nd addition)	0	2.0×10^6	1080	3.2	6.3
0.9% (w/v) (3rd addition)	0	2.0×10^6	1.6×10^5	1.1	6.3

2 - **Day two**

Bovine albumin concentration in the 0.5% dilution ALKAZYME bath	Number of surviving bacteria before the test (per ml)	Number of bacteria at start of test (per ml)	Number of surviving bacteria after 15 minutes' contact with the product (per ml)	Log reduction after 15 minutes' contact	Log reduction between each test
1.2% (w/v) (4th addition)	0	1.7×10^6	6.7×10^5	0.4	6.3
1.5% (w/v) (5th addition)	0	1.5×10^6	9.5×10^5	0.2	6.2

V **CONCLUSION**

The 0.5% (w/v) solution of **ALKAZYME** decontaminant powder in hard water with hardness of 30 degrees (French degrees) successfully destroyed microbe inocula of *Pseudomonas aeruginosa* on a large scale (between 1.5 and 2.2 million per ml), even after 5 successive additions of protein (bovine albumin - 0.3% per addition), which are usually highly antagonistic to the bactericidal action of disinfectants.

The destruction was obtained each time between 15 minutes and several hours after the various additions and inocula were introduced into the **ALKAZYME** solution.

These very high quantities of bacteria and albumin added are probably much greater that those likely to be found on the surfaces of contaminated soiled instruments after use in healthcare conditions and hence those likely to remain in decontamination baths.

We can therefore conclude that a 0.5% dilution **ALKAZYME** bath made up in hard water should resist 5 successive soaking periods of contaminated soiled objects, each representing an addition of protein-based interfering substances and microbial contaminants, before its decontamination efficacy is lost.

IRM
INSTITUT DE RECHERCHE MICROBIOLOGIQUE

INSTITUT DE RECHERCHE
MICROBIOLOGIQUE
SOUS ASSURANCE QUALITE

RAPPORT D'ESSAI

N° 285/0697-2

DELIVRE A : **ALKAPHARM**
30, av. Amiral Lemonnier
78160 MARLY-LE-ROI

PRODUIT : **ALKAZYME**

DEMANDE D'ESSAI DU : 13 juin 1997

ANALYSE REFERENCE : 285/0697

ESSAI : NORME EUROPEENNE NF EN 1275 (juin 1997) : antiseptiques et désinfectants chimiques - activité fongicide de base - méthode d'essai et prescription (phase 1)

Méthode par dilution - neutralisation.

Essai partiel sur *Candida albicans*.

Ce rapport comporte 5 pages.

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

Date d'émission : 28 juillet 1997

Emmanuelle HOCQUELOUX
Ingénieur Génie Biologique
Responsable des Essais

André CHANTEFORT
Docteur en Sciences Biologiques
Directeur

Rue Newton
Z.I. Mitry-Compans
F-77290 Mitry-Mory
Tél. 01.64.27.64.27
Fax 01.64.27.63.30
SARL au cap. de 200 000 F
R.C.Meaux B 351 422 183

I - IDENTIFICATION COMPLETE DE L'ECHANTILLON

Nom du produit : **ALKAZYME**

* numéro du lot : -

* fabricant : **ALKAPHARM**
30, av. Amiral Lemonnier
78160 MARLY-LE-ROI

Date de réception à l'I.R.M. : 13 juin 1997

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

Période d'analyse : juin - juillet 1997

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

Aspect du produit et de ses dilutions : poudre blanche, soluble dans l'eau.

II - CONDITIONS EXPERIMENTALES

Temps de contact : 15 min ± 10 s

Température d'essai : 20°C ± 1°C

Diluant du produit utilisé lors des essais : eau distillée stérile.

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

Souche fongique :

Candida albicans ATCC 10231 incubation 48h à 30°C ± 1°C

Méthode de dénombrement : dénombrement par inclusion en milieu gélosé.

III - MODE OPERATOIRE POUR LES ESSAIS PRELIMINAIRES

Neutralisant :

* composition : solution en eau distillée stérile de 5 % (v/v) de tween 80, 3 % (m/v) de saponine, 1 % (m/v) de lécithine, 0,1 % (m/v) de L-cystéine et 0,1 % (m/v) de L-histidine.

* mode de préparation : dissolution à chaud des différents ingrédients et filtration sur membrane SARTORIUS 165 55 K en acétate de cellulose de 0,45 µm de porosité.

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

Autres additions au milieu de dénombrement : néant.

Milieux de dénombrement particuliers : néant.

IV - VALIDATION DE LA METHODE DE NEUTRALISATION

Souche de microorganismes	Concentration en produit testée	Nombre de cellules viables (U.F.C./ml)			
		suspension bactérienne d'essai (N)	suspension bactérienne (Nv)	témoin de toxicité du neutralisant (Nx)	essai de dilution-neutralisation (Ny)
Candida albicans ATCC 10231	0,50 % (m/v)	$2,3x10^7$	900	85	84,5

La méthode de neutralisation est validée si :

- N est compris entre $1,5x10^7$ U.F.C./ml et $5x10^7$ U.F.C./ml ;
- N_v est compris entre $6x10^2$ U.F.C./ml et $1,5x10^3$ U.F.C./ml ;
- N_x et N_y sont supérieurs ou égaux à $0,05.N_v$;

La méthode de neutralisation est validée dans les conditions décrites sur la souche fongique testée pour une concentration en produit **ALKAZYME** de 0,50 % (v/v).

IV - RESULTATS DES ESSAIS

A) exprimé en nombre de cellules viables (Na) par ml du mélange produit-microorganismes

Souche de microorganismes	Temps de contact	Concentration testée		
		0,025 % (m/v)	0,050 % (m/v)	0,50 % (m/v)
Candida albicans ATCC 10231	15 min	>1500	870	<150

B) exprimé en réduction du nombre de cellules viables

Souche de microorganismes	Temps de contact	Concentration testée		
		0,025 % (m/v)	0,050 % (m/v)	0,50 % (m/v)
Candida albicans ATCC 10231	15 min	$<1,5x10^3$	$2,6 x10^3$	$>1,5x10^4$

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

V - CONCLUSION

Le produit **ALKAZYME** est fongicide selon la norme européenne NF EN 1275 (juin 1997), en 15 minutes de contact à 20°C sur la souche de référence *Candida albicans* ATCC 10231, à la concentration de 0,5 % (m/v).

RAPPORT D'ESSAI
008-2 REA 08

Essai selon la norme NF EN 13624 (Avril 2004)
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide des désinfectants chimiques utilisés pour les instruments en médecine.
Méthodes d'essai et exigences (Phase 2, étape1)

I. Identification de l'échantillon

Nom du produit :	**ALKAZYME**
Numéro de lot :	2005.09.02.44
Fabricant :	ALKAPHARM Parc Biocitech – 102 Avenue Gaston Roussel 93230 ROMAINVILLE
Date de réception :	/
Conditions de stockage :	A température ambiante et à l'abri de la lumière
Diluant du produit recommandé par le fabricant :	Non précisé
Substance(s) active(s) :	Non précisée
Aspect du produit :	Poudre blanche

II. Principe de l'essai

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

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

III. Résultats d'essai

NF EN 13624 (2004)	**ALKAZYME**	Lot : 2005.09.02.44

Période d'essai : 23/07/08 au 25/07/08

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

Méthode par dilution –neutralisation

Neutralisant : Diluant Pharmacopée + Neutralisant (VWR)

Dénombrement en profondeur

Température d'essai : 20°C

Température d'incubation : 30°C

Temps de contact additionnel: **15 minutes**:

Microorganisme d'essai : *Candida albicans* ATCC 10231

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

Aspect des dilutions du produit : Incolore à légèrement trouble

Stabilité des mélanges : mélanges stables

a. Validation et témoins

Souche (Collection et numéro)	Suspension de validation (N_v)	Suspension de validation (N_{v0})	Témoin de conditions expérimentales (A)	Témoin de neutralisant (B)	Validation de la méthode (C)
Candida albicans ATCC 10231	500	50	53	52,5	51

N_v est compris entre $4,5 \times 10^2$ et $1,8 \times 10^3$ UFC/ml

N_{v0} est compris entre 45 et 180 UFC/ml

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

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

b. Suspension d'essai

Souche (Collection et numéro)	Suspension d'essai (N)	lg N	N_0 (= N / 10)	lg N_0
Candida albicans ATCC 10231	$1,6 \times 10^7$	7,2	$1,6 \times 10^6$	6,2

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

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

c. Essai

		Nombre de cellules viables (Na) et taux de réduction (R) aux concentrations de produit testées		
Souche (Collection et numéro)		0, 0625% (m/m)	0,125% (m/m)	0,25% (m/m)
Candida albicans ATCC 10231	Na	>3300	>3300	< 140
	lg Na	>3,5	>3,5	< 2,2
	lg R	**<2,7**	**<2,7**	**> 4,0**

lg R = lg N_0 - lg Na

Une concentration est levuricide si lgR ≥ 4

IV. Conclusion

Le produit **ALKAZYME**, lot 2005.09.02.44, présente une activité levuricide en conditions de saleté, à 20°C et en 15 minutes de contact à la concentration de 0,25% (m/m).

Romainville, le 29/07/2008

Claire BREUGNOT
Technicienne

Raphaël DUGUÉ
Directeur du laboratoire

RAPPORT D'ESSAI

DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE VIS-A-VIS DU VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE DU PRODUIT ALKAZYME

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

Demande d'essai du: 10/04/2012

Références du dossier d'analyses: n°079V4-2012

ESSAIS DE VIRUCIDIE:

Selon la méthodologie de la norme européenne NF EN 14476+A1 (Janvier 2007) – antiseptiques et désinfectants chimiques – essais virucides quantitatifs de suspension pour les désinfectants et antiseptiques utilisés en médecine humaine.

Essais sur le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) d'un échantillon de produit désinfectant ALKAZYME.

Ce rapport d'essai comporte 14 pages et ne concerne que les échantillons étudiés.

Date d'émission : 17/07/2012

Stephanie MOROT-BIZOT
Docteur en microbiologie
Chargée de l'étude

Professeur Georges HERBEIN
Professeur des Universités Médecin Hospitalier
Expert scientifique

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

SOMMAIRE

1. LABORATOIRE AYANT REALISE LES ESSAIS
2. IDENTIFICATION COMPLETE DES ECHANTILLONS
3. CONDITIONS EXPERIMENTALES
4. VALIDATION DE LA METHODE
5. ESSAIS PROPREMENT DITS – CALCUL DE L'ACTIVITE VIRUCIDE
6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE
7. CONCLUSIONS
8. ANNEXES TECHNIQUES

1 LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES ESSAIS

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 BESANÇON
FRANCE

2 IDENTIFICATION COMPLETE DES ECHANTILLONS

Produit ALKAZYME

Numéro de lot: 2011.09.01.44

Date d'expiration: 2014.09

Fabricant: ALKAPHARM

Date de fabrication: 09/2011

Conditions de stockage: selon les indications fournies par le fabricant

Composants actifs: chlorure de didecyl dimethyl ammonium

Aspect: poudre blanche.

Diluant préconisé par le fabricant: eau potable

Date de réception au laboratoire: 11/04/2012

Période de l'étude: du 09/05/2012 au 26/06/2012

3 CONDITIONS EXPERIMENTALES

Date des essais: 09/05/2012 au 26/06/2012

Concentration cible : 0,5%

Température d'essai: 20°C ± 1°C

Méthode de titrage: virus titré en log $DICT_{50}$

Temps de contact: 15 minutes

Diluant du produit utilisé lors des essais: eau dure stérile

Souche de virus testée: VIH-1 souche pNL4-3Luc, cultivé sur cellules lymphoïdes 1G5, à 37°C, sous 5% CO2

Substance interférente: 3 g/l de sérum albumine bovine + 3 ml érythrocytes de mouton

Stabilité du produit en présence de substance interférente : trouble opaque blanc

Technique d'arrêt de l'action virucide: à froid

Titre viral :

Titrage par effet cytopathique de la suspension virale d'essai du virus VIH (calculé selon la méthode de Spearman-Kärber) = 7,625 log $DICT_{50}$.

4 VALIDATION DE LA METHODE

a) Méthodologie

Le produit ALKAZYME a été testé sur des cultures de cellules 1G5 et une légère cytotoxicité a été observée (jusqu'à la dilution 10^{-1}).

b) Sensibilité des cellules aux virus

Pour chacune des suspensions virales utilisées lors de la réalisation de ces essais, des titrages comparatifs du virus sont réalisés sur les cellules traitées ou non par le produit.

	Titre de virus (log $DICT_{50}$)		
Dilution produit	Suspension virale sur cellules non traitées	Suspension virale sur cellules traitées	**Différence de titre viral (log $DICT_{50}$)**
ALKAZYME10^{-1}	7,625	7,000	**0,625**

La différence de titre viral doit être inférieure à 1,0 log. Le produit ALKAZYME testé à la concentration indiquée ci-dessus ne montre pas d'influence sur la méthode de titrage du VIH.

c) Validations de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit ALKAZYME:

Concentration du produit	**Substances interférentes**	**Titre de virus (log $DICT_{50}$)**	**Différence avec la suspension virale d'essai**
ALKAZYME 0,5 %	3 g/l BSA	7,375	0,25
	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes de mouton	7,125	0,5

La méthode est validée si la différence de titre viral est $\leq 0{,}5$ log.

d) Essai d'inactivation de référence

	Titre de virus (log $DICT_{50}$)	**Réduction du titre viral (log $DICT_{50}$)**
Suspension virale témoin	7,375	
En formaldéhyde 1,4%		
Essai d'inactivation 5 min	7,50	-0,125
Essai d'inactivation 15 min	6,875	0,5
Essai d'inactivation 30 min	6,125	**1,25**

La validation des essais est effective si la réduction du titre viral entre la suspension témoin et la suspension soumise au formaldéhyde est comprise entre -0,5 et -2,5 log après 30 min. La réduction est de 1,25 log après 30 min et les conditions de la norme sont donc remplies.

5 ESSAIS PROPREMENT DITS – CALCUL DE L'ACTIVITE VIRUCIDE

Essai 1

La suspension virale d'essai a une concentration de **7,375 log $DICT_{50}$** avant essais pour le produit ALKAZYME à 0,5 % en substances interférentes 3 g/l BSA et de **7,125 log $DICT_{50}$** avant essais en substances interférentes 3 g/l BSA + 3 ml d'érythrocytes de mouton.

PRODUIT	substances interférente	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log $DICT_{50}$)	Réduction du titre viral
ALKAZYME	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes de mouton	0,5 %	15 min	20°C	3,000	**4,125**
	3 g/l BSA	0,5 %	15 min	20°C	2,875	**4,500**

Essai 2

La suspension virale d'essai a une concentration de **7,375 log $DICT_{50}$** avant essais pour le produit ALKAZYME à 0,5 % en substances interférentes 3 g/l BSA et de **7,125 log $DICT_{50}$** avant essais en substances interférentes 3 g/l BSA + 3 ml d'érythrocytes de mouton.

PRODUIT	substances interférente	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log $DICT_{50}$)	Réduction du titre viral
ALKAZYME	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes de mouton	0,5 %	15 min	20°C	2,5	**4,625**
	3 g/l BSA	0,5 %	15 min	20°C	2,5	**4,875**

Les concentrations testées de produit sont virucides si la réduction du titre viral est supérieure ou égale à 4,0 log.

6 VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE

Les essais réalisés satisfont aux critères de validation car:

- Le titre de la suspension virale d'essai est suffisamment important pour permettre une observation de réduction de 4 log après essais; il est de 7,625 log $DICT_{50}$ pour le virus VIH.

- La différence des titres entre témoin viral et virus de référence dans l'essai d'inactivation est comprise entre -0.5 et -2.5 après 30 min; la différence est de 1,25 log après 30 min d'inactivation par le formaldéhyde pour le virus VIH.

- Le produit testé n'affecte pas significativement la morphologie des cellules.

- Les conditions d'essai en saleté (érythrocytes de mouton + BSA) n'affectent pas l'infectivité du virus

- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité des cellules au virus VIH. Les titres de virus mis en contact avec les cellules traitées avec le produit et les cellules non traitées ont une différence inférieure à 1,0 log (la différence est de 0,625 log).

- La différence de titre entre l'essai de suspension virale et le contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant est inférieure à 0,5 log

7 CONCLUSIONS

Les essais réalisés sur le produit ALKAZYME lot n° 2011.09.01.44 ont démontré:

- que le produit **ALKAZYME employé à 0,5% possède une activité virucide sur le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH),** selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A1, **pour 15 minutes de contact à 20°C, en conditions de saleté.**

ANNEXE 1

Lignée cellulaire utilisée : cellules 1G5, ATCC, USA

Souche virale: VIH-1 (pNL4-3Luc), NIH, Bethesda, MA, USA

Tampons et milieux de culture:

- Tampon PBS: chlorure de sodium, Panreac, réf. 141659.1211, lot n° 0000204679; sodium phosphate dibasic, Sigma Aldrich, réf. S5136, lot n° BCBC7067V; sodium phosphate monobasic, Sigma Aldrich, réf. S5011, lot n° 1019K01021V
- Milieu MEM, Sigma Aldrich, réf. 0268, lot n° 040M8301
- Milieu DMEM, Sigma Aldrich, réf. D5796, lot n° RNBB9336
- Sérum de veau fœtal, Sigma Aldrich, F7524, lot n° 098K3397

Réactifs:

- Sérum albumine bovine en poudre, Sigma Aldrich, réf. 05479, lot n° STBB7838V
- Erythrocytes de mouton, Oxoïd, réf. SR 0051E, lot n° 40140000

Solution d'inactivation:

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

ANNEXE 2

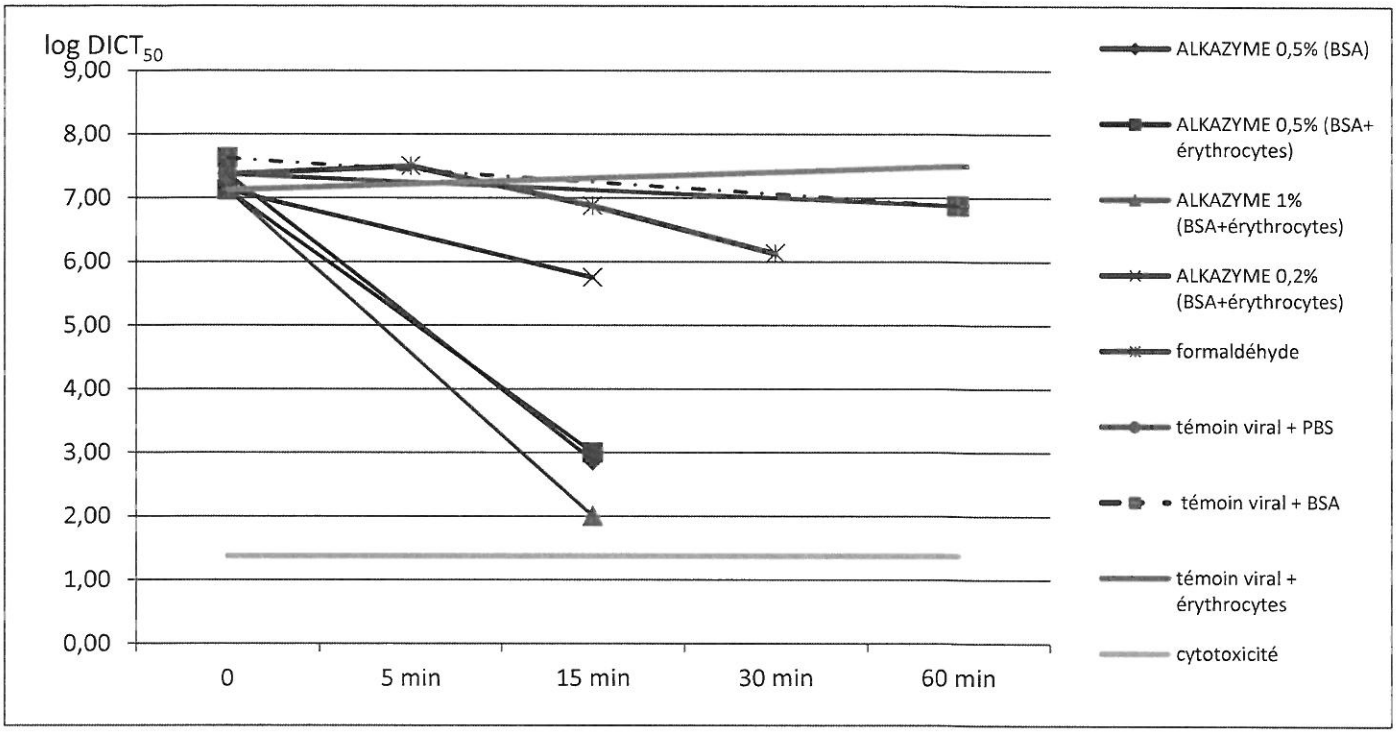
Tableau A1 - Titrage du virus VIH par effet cytopathique, par la méthode de calcul Spaerman-Kärber :

log $DICT_{50}$ = 7,625

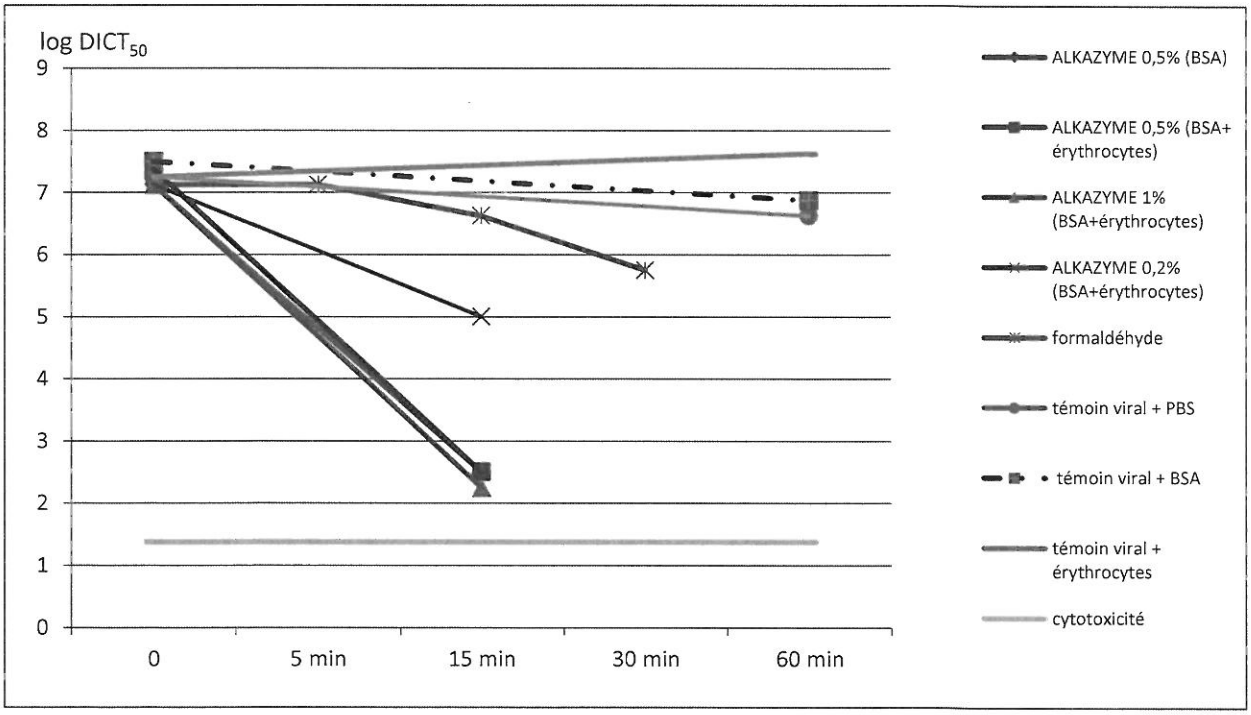
Dilution (- log)	Résultat	% résultats positifs
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	33333433	100
-6	22233333	100
-7	11111222	100
-8	00001000	12,5
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Somme des % de cultures positives		512,5

Figure 1 – représentations graphiques des résultats des essais :

Essai 1



Essai 2



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

Tableau A2 — Tableau des résultats du produit ALKAZYME et du VIH dans des conditions de saleté (3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes)

Produit	Concentration	Substance interférente	Niveau de cytotoxicité	Lg $DICT_{50}$					Réduction
				0	5 min	15 min	30 min	60 min	
ALKAZYME essai 1	0,5%	avec 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	1,375	7,125	N.T.	3	N.T.	N.T.	15 min R = 4,125
		avec 3 g/l BSA	1,375	7,375	N.T.	2,875	N.T.	N.T.	15 min R = 4,5
ALKAZYME essai 2	0,5%	avec 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	1,375	7,125	N.T.	2,5	N.T.	N.T.	15 min R= 4,625
		avec 3 g/l BSA	1,375	7,375	N.T.	2,5	N.T.	N.T.	15 min R= 4,875
Formaldéhyde essai1	1,40%	PBS	3,5	7,375	7,5	6,875	6,125	N.T.	
Formaldéhyde essai 2	1,40%	PBS	3,5	7,125	7,125	6,625	5,75	N.T.	
Témoin infectivité essai 1	N.A.	PBS	N.A.	7,375	N.T.	N.T.	N.T.	6,875	
Témoin infectivité essai 1	N.A.	avec 3 g/l BSA	N.A	7,625	N.T.	N.T.	N.T.	6,875	
Témoin infectivité essai 1	N.A.	avec 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A	7,125	N.T.	N.T.	N.T.	7,5	
Témoin infectivité essai 2	N.A.	PBS	N.A	7,25	N.T.	N.T.	N.T.	6,625	
Témoin infectivité essai 2	N.A.	avec 3 g/l BSA	N.A	7,5	N.T.	N.T.	N.T.	6,875	
Témoin infectivité essai 2	N.A.	avec 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A	7,25	N.T.	N.T.	N.T.	7,625	
Sensibilité des cellules au virus	ALKAZYME 10-1	N.A.	Cellules non traitées	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7,625	
		N.A.	Cellules traitées	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7	

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

Tableau A3 — Données brutes pour produit ALKAZYME avec 3 g/l BSA + 3 ml/l érythrocytes de mouton soumis à essai contre le VIH (titrage par effet cytopathique ; 8 puits)

Essai 1

	Concentration	Substance interférente	Temps de contact	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
ALKAZYME	0,5%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	15 min	4444	4444	0444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	0400	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Témoin viral	4444	4444	4444	3334	3333	2320	0101	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000	0000
	0,5%	3 g/l BSA	15 min	4444	3333	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4344	1110	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Témoin viral	4444	4444	4444	4444	4333	1111	1111	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	1111	1201	0000	0000	0000
ALKAZYME cytotoxicité	0,5%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A.	1201	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
				1222	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
Formaldéhyde	1,40%	PBS	5	4444	4444	4444	3333	2223	1111	1111	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	3331	3333	1111	1111	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	3443	3333	1111	1110	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	3332	3333	2100	1000	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	3333	2222	1100	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	3333	1122	1110	0000	0000	0000	
Formaldéhyde (cytotoxicité)	1,40%	PBS	N.A.	4444	4444	3334	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	4444	3333	0000						
Témoin viral infectivité	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	3333	2222	2222	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	3333	2220	0000	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	3333	2222	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	3322	3443	2222	2220	0000	0000	0000
Témoin viral infectivité	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	0100	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4333	2222	0010	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	1111	0110	0000	0000	0000
Témoin viral infectivité	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	0	4444	4444	4444	4444	2222	1111	1110	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	2222	1111	1100	0000	0000	0000
			60	4444	4444	3333	3333	2222	1111	1111	0000	0000	0000
				4444	4444	3333	3333	1111	1111	1111	0000	0000	0000

Essai 2

	Concentration	Substance interférente	Temps de contact	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
ALKAZYME	0,5%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	15 min	4444	3443	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	3333	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Témoin viral	4444	4444	4444	3334	3333	2320	0101	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000	0000
	0,5%	3 g/l BSA	15 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Témoin viral	4444	4444	4444	4444	4333	1111	1111	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	1111	1201	0000	0000	0000
ALKAZYME cytotoxicité	0,5%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A.	4444	4444	3333	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
				4444	3333	3033	0000	0000	0000	0000	0000	0000	N.T.
Formaldéhyde	1,40%	PBS	5	4444	4444	4444	3333	3333	1111	0100	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	4433	3333	1111	1111	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	2222	1111	0011	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	3334	3333	1100	1000	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	4443	1111	0001	0000	0000	0000	N.T.
				4444	4444	4444	3333	1122	0001	0000	0000	0000	
Formaldéhyde (cytotoxicité)	1,40%	PBS	N.A.	4444	4444	3334	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	4444	3333	0000						
Témoin viral infectivité	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	2222	1111	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	0011	0000	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	2222	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	3322	3443	2222	0010	0000	0000	0000
Témoin viral infectivité	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	3333	1111	0000	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	2322	1111	0010	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	1111	0110	0000	0000	0000
Témoin viral infectivité	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	0	4444	4444	4444	4444	2222	1111	1111	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	2222	1111	1100	0000	0000	0000
			60	4444	4444	3333	3333	2222	1111	1111	1000	0000	0000
				4444	4444	3333	3333	2222	1111	1111	0000	0000	0000

Validations avec autres concentrations testées :

Produit	Concentration	Substance interférente	Temps de contact	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
ALKAZYME	1% essai 1	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	15 min	4444	4040	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Témoin viral	4444	4444	4444	3334	3333	2320	0101	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000	0000
ALKAZYME	1% essai 2	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	15 min	4444	4330	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	3033	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Témoin viral	4444	4444	4444	3334	3333	2320	0101	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000	0000
ALKAZYME	0,2% essai 1	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	15 min	4444	4444	4444	3444	2222	2021	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	3333	2022	0000	0000	0000	0000	0000
			Témoin viral	4444	4444	4444	3334	3333	2320	0101	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000	0000
ALKAZYME	0,2% essai 2	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	15 min	4444	4444	4444	4444	0112	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	3434	0022	0000	0000	0000	0000	0000
			Témoin viral	4444	4444	4444	3334	3333	2320	0101	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000	0000

Produit	Concentration	Substance interférente	Niveau de cytotoxicité	Lg $DICT_{50}$		Réduction > 4 lg après	
				0	15 min		
ALKAZYME	1% essai 1	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	1,375	7,125	2	15 min R = 5,125	actif
	1% essai 2	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	1,375	7,125	2,25	15 min R = 4,875	actif
	0,2% essai 1	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	1,375	7,125	5,75	15 min R = 1,375	inactif
	0,2% essai 2	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	1,375	7,125	5	15 min R = 2,125	inactif

Sensibilité des cellules au virus :

Produit	dilution	Substance interférente		Dilutions								
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
ALKAZYME	10^{-1}	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	Cellules non traitées	4444	4444	4444	4444	3333	1111	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	3333	3333	1111	1000	0000	0000
			Cellules traitées	4444	4444	4444	2222	2222	1011	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	2222	2222	0010	0000	0000	0000

MIKROLAB GMBH
Laboratory for applied microbiology

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

TEST REPORT

20.01.2011

Test report no. A10ML1149-3H

Evaluation of the effectiveness of

ALKAZYME

Test virus: Herpes Simplex Virus type 1

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

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

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

1. Introduction

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

2. Test laboratory

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

3. Identification of the test sample

Manufacturer	ALKAPHARM
Name of product	ALKAZYME (product code 10)
Application	instrument disinfectant
Batch number	2009.08.01.44
Expiry date	2012.05
Active compound (s)	quaternary ammonium compound
Appearance and odour	white powder product specific
pH-value (s) in WSH	0.5 %: 10.84 (20°C)
Storage conditions	room temperature in the dark (area with restricted access)
Date of arrival in the laboratory	01.12.2010

4. Materials

4.1 Culture medium and reagents

- Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM, Lonza Group Ltd., catalogue no. BE12-707F)
- Fetal calf serum (Biochrom AG, article no. S 0115)
- 1.4 % Formaldehyde solution (Chemisch-technologisches Laboratorium Dr. Melzer, D-28199 Bremen)
- Aqua bidest. (Fresenius Kabi Deutschland, article no. P2N 1636071)
- PBS (Invitrogen, article no. 18912-014)
- BSA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, article no. CA-2153)
- sheep erythrocytes (Fiebig-Nährstofftechnik; article no. 31100100)

4.2 Virus and cells

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

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

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

4.3 Apparatus, glassware and small items of equipment

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

5. Experimental conditions

Test temperature	20°C ± 1.0°C
Concentration of test product	0.5 % and 0.05% (non-active range)
Contact times	1, 5, 15 and 60 minutes
Interfering substances	dirty conditions: 3.0 g/l bovine serum albumin (BSA) + 3.0 g/l erythrocytes
Stability of product in the mix with virus and interfering substance (0.5 %)	minor flocculations
Diluent	water of standardised hardness
Procedure to stop action of product	immediate dilution
Test virus strain	Herpes Simplex Virus type 1 prototype strain Kupka
Test period	01.12.2010 – 20.01.2011
End of testing	20.01.2011

6. Methods

6.1 Preparation of test virus suspension

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

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

6.2 Disinfectant

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

6.3 Infectivity assay

Infectivity was determined as endpoint titration according to EN 6.5.1 transferring 0.1 ml of each dilution into eight wells of a microtitre plate, beginning with the highest dilution. This

was followed by the addition of 0.1 ml of freshly trypsinized *BGM cells*. This cell suspension was adjusted to reach 10-15 x 10^3 cells per well. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5 % CO_2-atmosphere. The cytopathic effect was read by using an inverted microscope after seven days. Calculation of the infective dose $TCID_{50}$/ml was calculated with the method of Spearman (2) and Kärber (3) with the following formula:

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

meaning

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

6.4 Calculation and verification of virucidal activity

The virucidal activity of the test disinfectant was evaluated by calculating the decrease in titre in comparison with the control titration without disinfectant. The difference is given as reduction factor (RF).

According to EN 14476:2007-02, a disinfectant or a disinfectant solution at a particular concentration is having virus-inactivating efficacy if the titre is reduced at least by four $\log_{10}$-steps within the recommended exposure period.

6.5 Inactivation assay

Investigations for determination of virucidal activity followed the EN 14776. The instrument disinfectant ALKAZYME was examined as 0.05 % and 0.5 % solutions according to EN 5.2.2.2.
1, 5, 15 and 60 minutes were chosen as contact times.

Due to a more convenient handling, the volumes in this assay were 0.1 ml test virus suspension, 0.1 ml interfering substance (dirty conditions) and 0.8 ml test product. Immediately at the end of a chosen contact time, activity of the disinfectant was stopped by dilution to 10^{-8}.

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

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

6.6 Determination of cytotoxicity

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

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

6.7 Cell sensitivity to virus

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

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

6.8 Control of efficacy for suppression of disinfectant activity

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

6.9 Reference virus inactivation test

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

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

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

7. Verification of the methodology

The following criteria as mentioned in EN 8.3 were fulfilled:

a) The titre of the test virus suspension allowed the determination of 4 log_{10} reduction (0.5 %).

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

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

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

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

8. Results

Results of examination are shown in tables 1 to 6. Tables 1 to 5 demonstrate the raw data, whereas table 6 gives a summary of results.

The test product (0.5 %) was able to inactivate HSV type 1 after one minute exposure time in this quantitative suspension test. At that time point, no HSV type 1 was detectable. The reduction factors were ≥ 4.63 and ≥ 4.13 (mean ≥ 4.38). This corresponded to an inactivation of ≥ 99.99 %.

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

9. Summary

In summary, a sufficient reduction of virus titre could be achieved by the instrument disinfectant ALKAZYME as 0.5 % solution after an exposure time of one minute. Due to the lack of virological guidelines simulating practical conditions in Europe (phase 2, step 2 tests) the data of this quantitative suspension test lead to the recommendation to use the instruemt disinfectant ALKAZYME for inactivation of herpes simplex virus type 1 as follows:

dirty conditions 0.5 % 1 min

Bremen, 20.01.2011

- Dr. Jochen Steinmann -

9. Quality control

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

1) Chemicals Act of Germany, Appendix 1, dating of 01.08 1994 (BGBl. I, 1994, page 1703). Appendix revised at 14. 05. 1997 (BGBl. I, 1997, page 1060)
2) OECD Principles of Good Laboratory Practice (revised 1997); OECD Environmental Health and Safety Publications; Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring – Number 1. Environment Directorate, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris 1998.

The plausibility of the results was additionally confirmed by controls incorporated in the inactivation assays.

10. Records to be maintained

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

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

11. Literature

1. EN 14476:2007-02: Chemical disinfectants and antiseptics – virucidal quantitative suspension test - Test method and requirements (phase 2, step 1)

2. Spearman, C.: The method of `right or wrong cases` (constant stimuli) without Gauss's formulae.
Brit J Psychol; 2 1908, 227-242

3. Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Arch Exp Path Pharmak; 162, 1931, 480-487

Appendix

Table 1: Raw data of ALKAZYME (0.5 %) tested against HSV type 1 (dirty conditions)

Table 2: Raw data of ALKAZYME (0.5 %) tested against HSV type 1 (dirty conditions)

Table 3: Raw data of ALKAZYME (0.05 %) tested against HSV type 1 (dirty conditions)

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

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

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

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

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
Test product	0.5%	dirty	1	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			5	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product cytotoxicity	0.5%	dirty	n.a.	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	3232 3434	2122 2001	2000 3000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	0120 2001	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Virus control	n.a.	dirty	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 2444	0044 0004	0020 0004	0000 0000	n.d.

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

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

Table 2: Raw data of ALKAZYME (0.5 %) tested against HSV type 1 (quantal test; 8 wells) (2474)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
Test product	0.5%	dirty	1	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
Test product cytotoxicity	0.5%	dirty	n.a.	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	3232 3434	2122 2001	2000 3000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	0120 2001	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Virus control	n.a.	dirty	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 2003	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 0444	0040 0000	2000 0000	0000 0000	n.d.

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

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

Table 3: Raw data of ALKAZYME (0.05 %) tested against HSV type 1 (quantal test; 8 wells) (2450)

Product	Concentration	Interfering substance	Contact time (min)	Dilutions (log_{10})								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
Test product	0.05%	dirty	1	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0400 0000	0000 0000	n.d.
			5	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0403	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product cytotoxicity	0.05%	dirty	n.a.	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Formaldehyde	0.7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	3232 3434	2122 2001	2000 3000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	0120 2001	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
Formaldehyde cytotoxicity	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Virus control	n.a.	dirty	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 2444	0044 0004	0020 0004	0000 0000	n.d.

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

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

Table 4: Control of efficacy for suppression of disinfectant activity (0.5 %) (2474)

Product	Interfering substance	Dilutions (log_{10})								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Test product	PBS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product	clean	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product	dirty	tttt tttt	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4000 0040	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.

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

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

Table 5: Raw data (HSV type 1) for cell sensitivity (0.5 %) (2474)

Product	Comparative virus titration with	Product dilution	Dilutions (log_{10})								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
PBS	PBS	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PBS	clean	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PBS	dirty	-	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4304 4444	0044 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.
Test product	PBS	1:100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product	clean	1:100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Test product	dirty	1:100	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 4000	0000 0000	0000 0000	n.d.

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

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

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

Product	Con-centration	Interfering substance	Level of cytotoxicity	log_{10} $TCID_{50}$/ml after ....min									> 4 log_{10} reduction after ... min
				0	0.25	0.5	1.0	2.0	5.0	15.0	30.0	60.0	
Product	0.5%	dirty	2.50	n.d.	n.d.	n.d.	≤ 2.50	n.d.	≤ 2.50	≤ 2.50	n.d.	n.d.	1.0
Product	0.5%	dirty	2.50	n.d.	n.d.	n.d.	≤ 2.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	≤ 2.50	1.0
Product	0.05%	dirty	1.50	n.d.	n.d.	n.d.	6.88	n.d.	6.75	n.d.	n.d.	n.d.	> 5.0
Form-aldehyde	0.7% (m/V)	PBS	3.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.50	≤4.00	≤3.50	≤ 3.50	≥ 30 min
Virus control	n.a.	dirty	n.a.	6.75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.13 6.63	n.a.
Suppression control	0.5%	dirty	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.75	n.d.	n.a.
Sens. control with PBS	n.a.	n.a.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.63	n.a.
Sens. control Product	n.a.	n.a.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.63	n.a.

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

TEST REPORT

VIRUCIDAL ACTIVITY OF THE ALKAZYME PRODUCT AGAINST THE HEPATITIS B VIRUS (PRV MODEL)

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

Date of request : 03/12/2014
Study number: n°041V04-2014-01

VIRUCIDAL TESTS:

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

Tests using the ALKAZYME product, batch #2012.04.01.44, on the Hepatitis B virus (viral model: PseudoRabiesVirus PRV).
This test report included 13 pages.

Study completion date: 04/10/2014
Reedition: 06/20/2014

Stephanie MOROT-BIZOT
PhD in microbiology
Study director

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

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

SUMMARY

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

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

1 PERFORMING LABORATORY

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 BESANÇON
FRANCE

2 PRODUCT IDENTITY

ALKAZYME

Batch # 2012.04.01.44

Expiration date: non communicated

Manufacturer: ALKAPHARM

Manufacturing date: non communicated

Storage conditions: as recommended by the manufacturer

Active substances : non communicated

Appearance of the product: white powder

Product diluent recommended by the manufacturer for use: tap water

Date of delivery of the product: 03/25/2014

Date of tests: from 03/12/2014 to 04/09/2014

3 EXPERIMENTAL CONDITIONS

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

Titration units: log $TCID_{50}$

Exposure time: 15 minutes

Diluent used for the product: hard water

Test concentrations: 0,50% - 0,20% - 0,10%

Viral strain: PRV (IFL), grown on VERO cells, at 37°C, under 5% CO2 atmosphere

Organic soil load: 3 g/l bovine serum albumin + 3 ml/l sheep erythrocytes

Product stability: good

Stop solution: cold shock

Viral titer:

Viral titers are expressed in log $TCID_{50}$ per ml, according to the SPEARMAN-KÄRBER method. Titer of PRV suspension assay = 6,75 log $TCID_{50}$.

4 VALIDATION

a) Methodology

The VERO cells were exposed to the ALKAZYME product and a weak cytotoxic effect was observed at the dilution 10^{-1}.

b) Sensibility assays

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

	Viral titer (log $TCID_{50}$)		
Product dilution	Untreated cell cultures	Treated cell cultures	**Viral titer (log $TCID_{50}$)**
ALKAZYME 10^{-2}	6,50	6,25	**0,25**

According to the European standard EN 14476, the ALKAZYME product used at the dilution of 10^{-2} does not have an effect on the PRV titration method (the difference between viral titers must be < 1,0 log).

c) Validations of the cold shock method:

Product Concentration	**Organic soil load**	**Viral titer (log $TCID_{50}$)**	**Difference with the viral suspension**
ALKAZYME 0,50%	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes de mouton	Trial 1 : 6,750	0,000
		Trial 2 : 6,500	0,125
	3 g/l BSA	Trial 1 : 6,625	0,125
		Trial 2 : 6,500	0,250

The difference between viral titer and viral suspension must be $\leq 0,5$ log

c) Inactivation assays of the virus with a control solution

	Viral titer (log $TCID_{50}$)	**Viral titer reduction (log $TCID_{50}$)**
Viral suspension control	6,500	
formaldehyde 1,4%		
inactivation 5 min	6,500	0,000
inactivation 15 min	6,500	0,000
inactivation 30 min	5,500	**1,000**

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

5 VIRUCIDAL ASSAYS

Trial 1

The viral suspension was titrated at **6,75 log $TCID_{50}$** prior the assays.

PRODUCT	Concentration (v/v)	Time of exposure	Temperature	**Viral titer (log $TCID_{50}$)**	**Viral titer reduction**
ALKAZYME	**0,50 %**	15 min	20°C	2,750	**4,00**

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

Trial 2

The viral suspension was titrated at **6,50 log $TCID_{50}$** prior the assays.

PRODUCT	Concentration (v/v)	Time of exposure	Temperature	**Viral titer (log $TCID_{50}$)**	**Viral titer reduction**
ALKAZYME	**0,50 %**	15 min	20°C	2,375	**4,125**

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

6 VALIDATION OF THE METHODOLOGY

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

- The viral titers of the suspension tests were sufficient in order to observe a reduction of 4 log after time exposure with the product. The viral titer of the PRV was 6,75 log TCID50.
- The virus was inactivated with the control solution of 1,4 % formaldehyde after 30 min of exposure : the reduction observed was of 1,00 log for the PRV.
- The ALKAZYME product does not have a cytotoxic effect on the VERO cells.
- The organic soil load (3 g/l BSA + 3 ml/l sheep erythrocytes) does not affect the infectious capacity of the PRV.
- The ALKAZYME product does not affect the infectious capacity of the virus: the differences in viral titers between the virus inoculated on VERO cells and the virus inoculated on the VERO cells treated with the ALKAZYME product was ≤ 1,0 log (0,25 log).
- The difference of viral titers and viral titers in the cold shock method is ≤ 0,5 log

7 CONCLUSION

The assays performed with the ALKAZYME batch n° 2012.04.01.44 product demonstrated that:

- The **ALKAZYME product demonstrated a virucidal activity on the Hepatitis B Virus (PRV model) from the concentration 0,50%,** as required by the European standard EN 14476, following a **15 minutes** exposure period, at 20°C, in dirty conditions.

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

TECHNICAL APPENDIX 1

Cell line: VERO cells, R & D Biotech, ref. 84009, batch n° 110118-110V

Viral strain: **Pseudo Rabies Virus- Suid Herpes Virus type 1, Friedrich Loeffler Institut**, batch n°3/2091233/151812.

Buffer and reagents:

- PBS buffer: sodium chloride, Dominique DUTSCHER, ref. 19032391, batch n° 836751; sodium phosphate dibasic, Sigma Aldrich, ref. S5136, batch n° BCBC7067V; sodium phosphate monobasic, Sigma Aldrich, ref. S5011, batch n° 1019K01021V
- DMEM media, PAN Biotech, ref. P04-03590, batch n° 8870813
- Fœtal calf sera, Sigma Aldrich, F7524, batch n°062M3396

Reagents:

- Bovine albumin serum (powder), Sigma Aldrich, ref. P6154, batch n° M10637P6154
- Sheep erythrocytes, Oxoïd, ref. SR 0051E, batch n° 58887000

Inactivation solution:

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

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

TECHNICAL APPENDIX 2

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

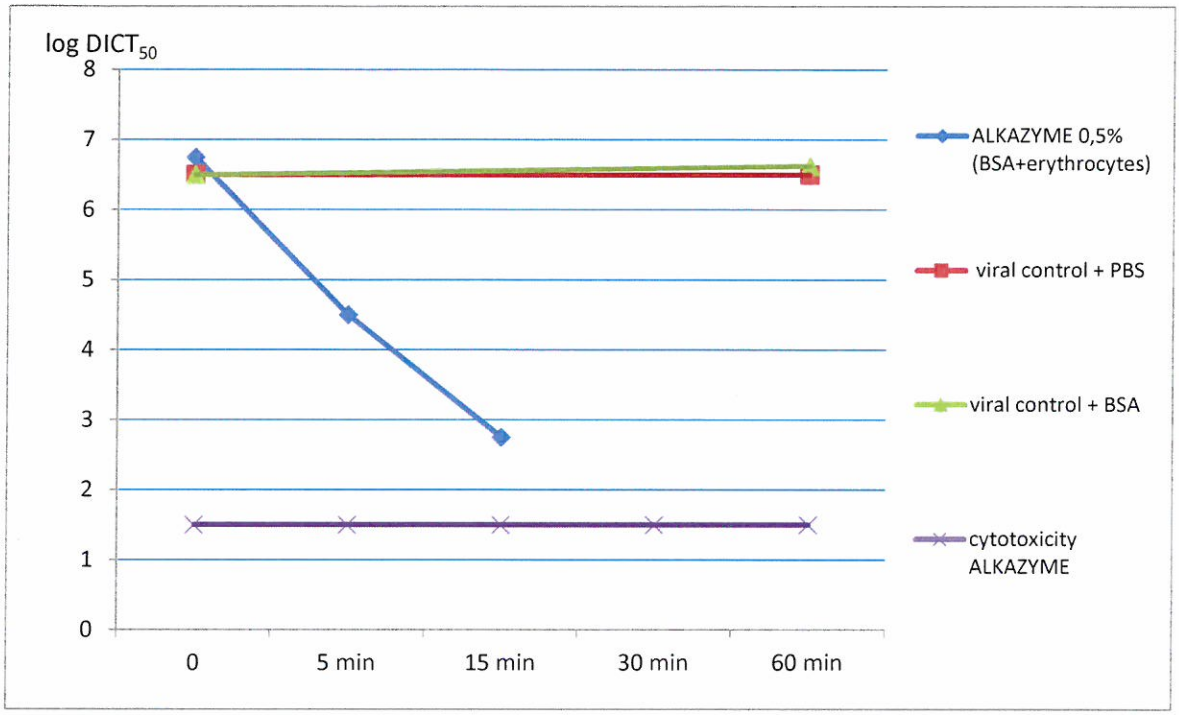
log $TCID_{50}$ = 6,75

Dilution (- log)	Results	% positive results
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	33333442	100
-6	23322233	100
-7	00000110	25
-8	00000000	0
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Sum of positives cultures %		425

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

Figure 1 – Chart of the results :

Trial 1



Trial 2

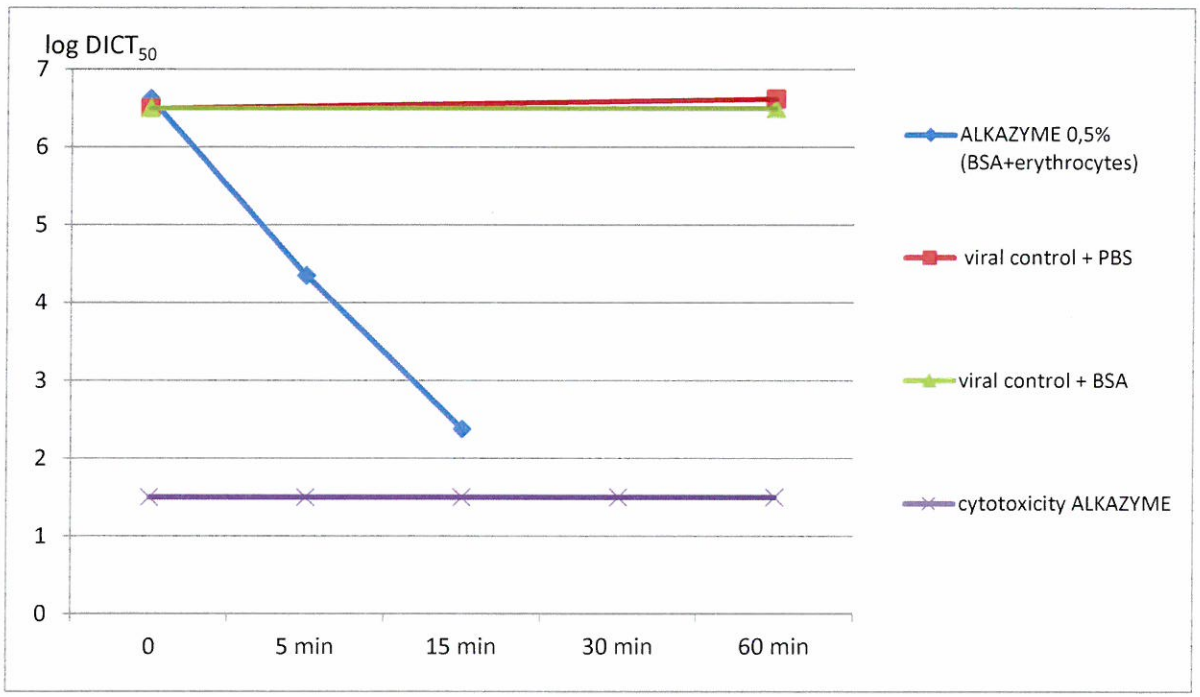


Table A2 — results for the ALKAZYME product and the PRV in dirty conditions (3 g/l BSA + 3 ml/l sheep erythrocytes)

Product	Concentration	Organic soil load	Cytotoxicity level	Lg $TCID_{50}$					Reduction
				0	5 min	15 min	30 min	60 min	
ALKAZYME TRIAL 1	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	1,5	6,75	N.T.	2,75	N.T.	N.T.	15 min R = 4
ALKAZYME TRIAL 2	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	1,5	6,5	N.T.	2,375	N.T.	N.T.	15 min R = 4,125
Formaldehyde Trial 1	0,70%	PBS	2,375	6,5	6,5	6,5	5,5	N.T.	
Formaldehyde Trial 2	0,70%	PBS	2,25	6,5	6,5	6,375	5,5	N.T.	
Infectivity control Trial 1	N.A.	PBS	N.A.	6,5	N.T.	N.T.	N.T.	6,5	
Infectivity control Trial 1	N.A.	3 g/l BSA	N.A	6,5	N.T.	N.T.	N.T.	6,625	
Infectivity control Trial 1	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	N.A	6,625	N.T.	N.T.	N.T.	6,625	
Infectivity control Trial 2	N.A.	PBS	N.A	6,5	N.T.	N.T.	N.T.	6,625	
Infectivity control Trial 2	N.A.	3 g/l BSA	N.A	6,5	N.T.	N.T.	N.T.	6,5	
Infectivity control trial 2	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	N.A	6,5	N.T.	N.T.	N.T.	6,5	
Sensitivity of the cells	10^{-2}	N.A.	Untreated cells	6,5	N.T.	6,5	N.T.	N.T.	
		N.A.	Treated cells	6,5	N.T.	6,25	N.T.	N.T.	

Table A3 — Raw results for the ALKAZYME product in dirty conditions (3 g/l BSA + 3 ml/l sheep erythrocytes), against PRV

TRIAL 1

	Concentration	Organic soil load	Time of exposure	Dilutions							
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
ALKAZYME	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	15 min	4444	3233	1100	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	2333	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	2222	2111	1111	1000	0000
				4444	4444	4444	2222	1111	1111	0000	0000
	0,50%	3 g/l BSA	15 min	4444	1010	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	1122	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	3322	1111	1111	1000	0000
				4444	4444	4444	2222	1111	1111	0000	0000
ALKAZYME cytotoxicity	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	N.A.	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Formaldehyde	0,70%	PBS	5	4444	4444	4444	3333	3323	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	3333	2222	1111	0000	0000
			15	4444	4444	4444	3222	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000
			30	4444	4444	2233	1111	1111	0000	0000	0000
				4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000	0000
Formaldehyde (cytotoxicity)	0,70%	PBS	N.A.	4444	1111	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	1011	0000	0000				
Viral control of infectivity	N.A.	PBS	0	4444	4444	3333	3344	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
			60	4444	4444	3333	2222	1112	1111	0000	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
Viral control of infectivity	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	3333	1212	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	3333	1212	1111	1111	0000	0000
			60	4444	4444	3333	2222	1111	1111	1000	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
Viral control of infectivity	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	0	4444	4444	3333	2222	1111	1111	0001	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
			60	4444	4444	2222	2322	1111	1111	1000	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000

TRIAL 2

	Concentration	Organic soil load	Time of exposure	Dilutions							
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
ALKAZYME	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	15 min	4444	3233	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	2320	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	3233	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	2222	1111	1111	0000	0000
	0,50%	3 g/l BSA	15 min	4444	1111	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	2332	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000
ALKAZYME cytotoxicity	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	N.A.	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Formaldehyde	0,70%	PBS	5	4444	4444	4444	3433	3333	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	3333	2233	1111	0000	0000
			15	4444	4444	4444	2221	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	2222	1111	1011	0000	0000
			30	4444	4444	2233	1111	1111	0000	0000	0000
				4444	4444	1111	1111	1111	0000	0000	0000
Formaldehyde (cytotoxicity)	0,70%	PBS	N.A.	4444	1011	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	1011	0000	0000				
Viral control of infectivity	N.A.	PBS	0	4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
			60	4444	4444	3333	2222	2122	1111	1000	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
Viral control of infectivity	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	3333	2111	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	3333	1111	1111	1111	0000	0000
			60	4444	4444	3333	2222	2111	1111	0000	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
Viral control of infectivity	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	0	4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
			60	4444	4444	3334	2212	2222	1111	0000	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000

Validations:

Product	Concentration	Organic soil load	Cytotoxicity level	Lg $TCID_{50}$		Reduction > 4 lg	
				0	15 min		
ALKAZYME	0,20%	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	1,5	6,5	4,5	R= 2	INACTIVE
ALKAZYME	0,10%	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	1,5	6,5	5,5	R= 1	INACTIVE

Cells sensitivity:

Product	dilution	Organic soil load		Dilutions						
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
ALKAZYME	10^{-2}	3 g/l BSA + 3 ml/l érythrocytes	Untreated cells	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
				4444	3333	1222	1111	1111	0000	0000
			Treated cells	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
				4444	3333	2211	1111	1010	0000	0000

Untreated cells : T_{NT} = 6,50 log $DCIT_{50}$

Treated cells : T_T = 6,25 log $DCIT_{50}$

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

TEST REPORT

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

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

Date of request : 03/12/2014
Study n°: n°041V03-2014-01

VIRUCIDAL TESTS:

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

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

This test report included 13 pages.

Study completion date: 04/10/2014
Reedition: 06/17/2014

Stephanie MOROT-BIZOT
PhD in microbiology
Study director

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

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

SUMMARY

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

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

1 PERFORMING LABORATORY

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 BESANÇON
FRANCE

2 PRODUCT IDENTITY

ALKAZYME

Batch # 2012.04.01.44

Expiration date: non communicated

Manufacturer: ALKAPHARM

Manufacturing date: non communicated

Storage conditions: as recommended by the manufacturer

Active substances : non communicated

Appearance of the product: white powder

Product diluent recommended by the manufacturer for use: tap water

Date of delivery of the product: 03/25/2014

Date of tests: from 03/12/2014 to 04/09/2014

3 EXPERIMENTAL CONDITIONS

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

Titration units: log $TCID_{50}$

Exposure time: 15 minutes

Diluent used for the product: hard water

Test concentrations: 0,50% - 0,20% - 0,10%

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

Organic soil load: 3 g/l bovine serum albumin + 3 ml/l sheep erythrocytes

Product stability: good

Stop solution: cold shock

Viral titer:

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

4 VALIDATION

a) Methodology

The VERO cells were exposed to the ALKAZYME product and a weak cytotoxic effect was observed at the dilution 10^{-1}.

b) Sensibility assays

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

	Viral titer (log $TCID_{50}$)		
Product dilution	Untreated cell cultures	Treated cell cultures	**Viral titer (log $TCID_{50}$)**
ALKAZYME 10^{-2}	6,875	6,500	**0,375**

According to the European standard EN 14476, the ALKAZYME product used at the dilution of 10^{-2} does not have an effect on the BVDV titration method (the difference between viral titers must be < 1,0 log).

c) Validations of the cold shock method:

Product Concentration	**Organic soil load**	**Viral titer (log $TCID_{50}$)**	**Difference with the viral suspension**
ALKAZYME 0,50%	3 g/l BSA + 3 ml sheep erythrocytes	Trial 1 : 6,875	0,375
		Trial 2 : 7,000	0,250
	3 g/l BSA	Trial 1 : 7,000	0,250
		Trial 2 : 6,875	0,375

The difference between viral titer and viral suspension must be $\leq 0,5$ log.

d) Inactivation assays of the virus with a control solution

	Viral titer (log $TCID_{50}$)	**Viral titer reduction (log $TCID_{50}$)**
Viral suspension control	6,875	
formaldehyde 1,4%		
inactivation 5 min	6,625	0,250
inactivation 15 min	6,375	0,500
inactivation 30 min	5,875	**1,000**

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

5 VIRUCIDAL ASSAYS

Trial 1

The viral suspension was titrated at **6,875 log $TCID_{50}$** prior the assays.

PRODUCT	Concentration (v/v)	Time of exposure	Temperature	**Viral titer (log $TCID_{50}$)**	**Viral titer reduction**
ALKAZYME	**0,50 %**	15 min	20°C	2,625	**4,250**

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

Trial 2

The viral suspension was titrated at **7,000 log $TCID_{50}$** prior the assays.

PRODUCT	Concentration (v/v)	Time of exposure	Temperature	**Viral titer (log $TCID_{50}$)**	**Viral titer reduction**
ALKAZYME	**0,50 %**	15 min	20°C	2,750	**4,250**

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

6 VALIDATION OF THE METHODOLOGY

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

- The viral titers of the suspension tests were sufficient in order to observe a reduction of 4 log after time exposure with the product. The viral titer of the BVDV was 7,25 log TCID50.
- The virus was inactivated with the control solution of 1,4 % formaldehyde after 30 min of exposure : the reduction observed was of 1,00 log for the BVDV.
- The ALKAZYME product does not have a cytotoxic effect on the VERO cells.
- The organic soil load (3 g/l BSA + 3 ml/l sheep erythrocytes) does not affect the infectious capacity of the BVDV.
- The ALKAZYME product does not affect the infectious capacity of the virus: the differences in viral titers between the virus inoculated on VERO cells and the virus inoculated on the VERO cells treated with the ALKAZYME product was ≤ 1,0 log (0,375 log).
- The difference of viral titers and viral titers in the cold shock method is ≤ 0,5 log

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

7 CONCLUSION

The assays performed with the ALKAZYME batch n° 2012.04.01.44 product demonstrated that:

- The **ALKAZYME product demonstrated a virucidal activity on the Hepatitis C Virus (BVDV model) from the concentration 0,50%,** as required by the European standard EN 14476, following a **15 minutes** exposure period, at 20°C, in dirty conditions.

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

TECHNICAL APPENDIX 1

Cell line: VERO cells, R & D Biotech, ref. 84009, batch n° 110118-110V

Viral strain: **Bovine Viral Diarrhea Virus,** ATCC ref. VR-534, batch n°10W

Buffer and reagents:

- PBS buffer: sodium chloride, Dominique DUTSCHER, ref. 19032391, batch n° 836751; sodium phosphate dibasic, Sigma Aldrich, ref. S5136, batch n° BCBC7067V; sodium phosphate monobasic, Sigma Aldrich, ref. S5011, batch n° 1019K01021V
- DMEM media, PAN Biotech, ref. P04-03590, batch n° 8870813
- Fœtal calf sera, Sigma Aldrich, F7524, batch n°062M3396

Reagents:

- Bovine albumin serum (powder), Sigma Aldrich, ref. 05479, batch n° STBB7838V
- Sheep erythrocytes, Oxoïd, ref. SR 0051E, batch n° 58887000

Inactivation solution:

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

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

TECHNICAL APPENDIX 2

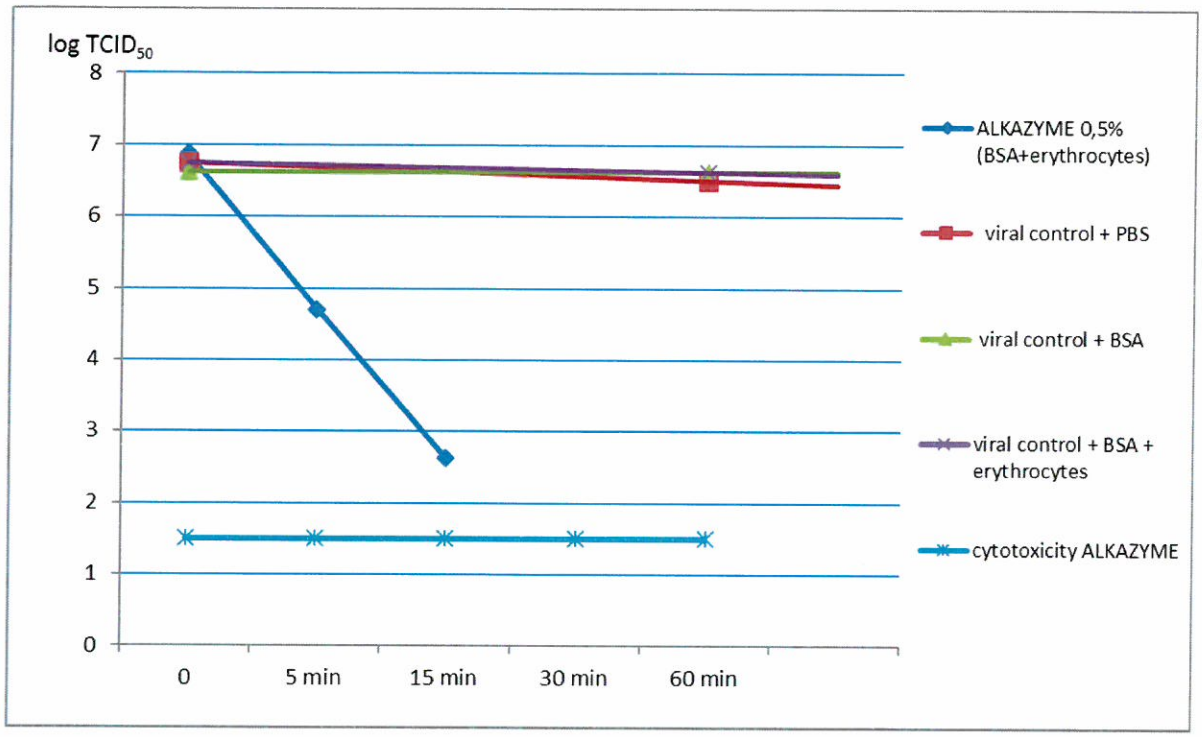
Table A1 - Titration of BVDV virus by cytopathic effect, with the Spaerman-Kärber method:

log $TCID_{50}$ = 7,25

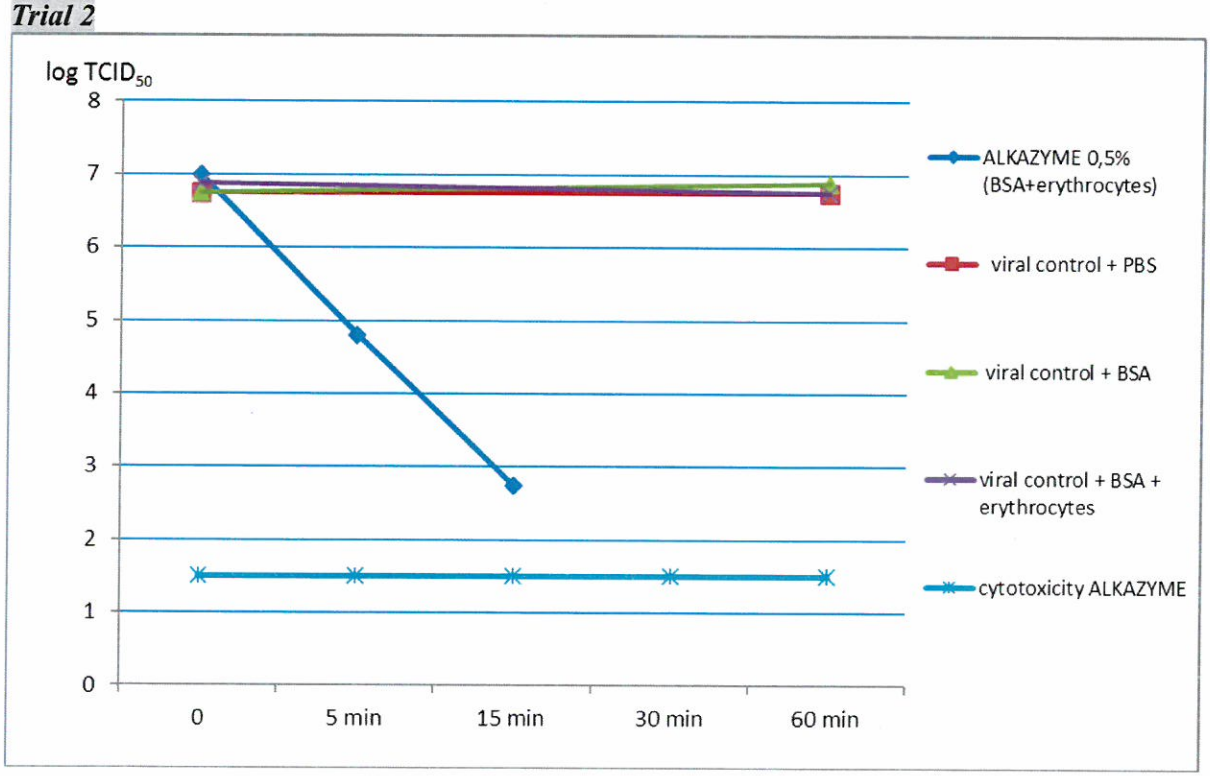
Dilution (- log)	Results	% positive results
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	33344444	100
-6	33333333	100
-7	10011111	75
-8	00000000	0
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Sum of positives cultures %		475

Figure 1 – Chart of the results :

Trial 1



Trial 2



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

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

Product	Concentration	Organic soil load	Cytotoxicity level	Lg $TCID_{50}$					Reduction
				0	5 min	15 min	30 min	60 min	
ALKAZYME trial 1	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	1,5	6,875	N.T.	2,625	N.T.	N.T.	15 min R = 4,25
ALKAZYME trial 2	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	1,5	7	N.T.	2,75	N.T.	N.T.	15 min R = 4,25
Formaldehyde Trial 1	0,70%	PBS	2,5	6,875	6,625	6,375	5,875	N.T.	
Formaldehyde Trial 2	0,70%	PBS	2,5	7	6,75	6,125	5,625	N.T.	
Infectivity control Trial 1	N.A.	PBS	N.A.	6,75	N.T.	N.T.	N.T.	6,75	
Infectivity control Trial 1	N.A.	3 g/l BSA	N.A	6,625	N.T.	N.T.	N.T.	6,75	
Infectivity control Trial 1	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	N.A	6,75	N.T.	N.T.	N.T.	6,875	
Infectivity control Trial 2	N.A.	PBS	N.A	6,75	N.T.	N.T.	N.T.	6,75	
Infectivity control Trial 2	N.A.	3 g/l BSA	N.A	6,75	N.T.	N.T.	N.T.	6,875	
Infectivity control trial 2	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	N.A	6,875	N.T.	N.T.	N.T.	6,75	
Sensitivity of the cells	10^{-2}	N.A.	Untreated cells	6,875	N.T.	6,875	N.T.	N.T.	
		N.A.	Treated cells	6,875	N.T.	6,5	N.T.	N.T.	

Table A3 — Raw results for the ALKAZYME product in dirty conditions (3 g/l BSA + 3 ml/l sheep erythrocytes), against BVDV

Trial 1

	Concentration	Organic soil load	Time of exposure	Dilutions							
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
ALKAZYME	0,5% BSA+ erythrocytes	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	15 min	4444	1112	1000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	2222	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	3222	1111	1111	1011	0000
				4444	4444	4444	2222	1111	1111	0000	0000
	0,5% BSA	3 g/l BSA	15 min	4444	1112	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	1111	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	3443	3322	1111	1111	1111	0000
				4444	4444	4444	3333	1111	1111	0000	0000
ALKAZYME cytotoxicity	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	N.A.	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Formaldehyde	0,70%	PBS	5	4444	4444	4444	2221	2222	1111	1000	0000
				4444	4444	4444	2223	2222	1111	0000	0000
			15	4444	4444	4444	1222	1111	1011	0000	0000
				4444	4444	4444	2222	1111	1111	0000	0000
			30	4444	4444	2222	1111	1111	1110	0000	0000
				4444	4444	2322	1111	1111	0000	0000	0000
Formaldehyde (cytotoxicity)	0,70%	PBS	N.A.	4444	1111	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	1222	0000	0000				
Viral control of infectivity	N.A.	PBS	0	4444	4444	3333	1111	1111	1111	1100	0000
				4444	4444	3333	1111	1111	1111	0000	0000
			60	4444	4444	3333	1221	1111	1111	1100	0000
				4444	4444	3333	2111	1111	1111	0000	0000
Viral control of infectivity	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	3333	2122	1111	1111	0100	0000
				4444	4444	3333	2111	1111	1111	0000	0000
			60	4444	4444	3333	2222	1111	1111	0110	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
Viral control of infectivity	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	0	4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	1000	0000
			60	4444	4444	3334	2212	1111	1111	1110	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000

Trial 2

	Concentration	Organic soil load	Time of exposure	Dilutions							
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
ALKAZYME	0,5% en BSA+ erythrocytes	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	15 min	4444	2111	1100	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	1122	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	2222	2111	1111	1111	0000
				4444	4444	4444	2222	1111	1111	0000	0000
	0,5% BSA	3 g/l BSA	15 min	4444	1111	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	1111	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Viral control	4444	4444	4444	3322	1111	1111	1110	0000
				4444	4444	4444	2222	1111	1111	0000	0000
ALKAZYME cytotoxicity	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	N.A.	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Formaldehyde	0,70%	PBS	5	4444	4444	4444	2333	2222	1111	1100	0000
				4444	4444	4444	2222	2222	1111	0000	0000
			15	4444	4444	4444	1112	1111	1000	0000	0000
				4444	4444	4444	1111	1111	1111	0000	0000
			30	4444	4444	2111	1111	1111	0010	0000	0000
				4444	4444	1111	1111	1111	0000	0000	0000
Formaldehyde (cytotoxicity)	0,70%	PBS	N.A.	4444	1111	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
				4444	2241	0000	0000				
Viral control of infectivity	N.A.	PBS	0	4444	4444	3333	3323	1111	1111	1100	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
			60	4444	4444	3333	2222	2211	1111	1100	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
Viral control of infectivity	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	3333	2211	1111	1111	1100	0000
				4444	4444	3333	1111	1111	1111	0000	0000
			60	4444	4444	3333	2213	1212	1111	1110	0000
				4444	4444	3333	2222	2111	1111	0000	0000
Viral control of infectivity	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	0	4444	4444	3333	1211	1111	1111	1010	0000
				4444	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
			60	4444	4444	2222	2333	1111	1111	1010	0000
				4444	4444	3333	3322	1111	1111	0000	0000

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

Validations:

Product	Concentration	Organic soil load	Cytotoxicity level	Lg $TCID_{50}$		Reduction > 4 lg	
				0	15 min		
ALKAZYME	0,20%	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	1,5	6,875	3,75	R= 3,125	INACTIVE
ALKAZYME	0,10%	3 g/l BSA + 3 ml/l erythrocytes	1,5	6,875	5,25	R= 1,625	INACTIVE

Cells sensitivity:

Product	dilution	Organic soil load		Dilutions						
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
ALKAZYME	10^{-2}	3 g/l BSA + 3 ml erythrocytes	Untreated cells	4444	3333	2222	1111	1111	1110	0000
				4444	3333	2233	1111	1111	0000	0000
			Treated cells	4444	3333	2222	1111	1111	0000	0000
				4444	3333	2322	1111	1111	0000	0000

Untreated cells : T_{NT} = 6,875 log $DCIT_{50}$

Treated cells : T_T = 6,500 log $DCIT_{50}$

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

EVIC-CEBA
LABORATOIRE DE RECHERCHE ET D'EXPERIMENTATION

RAPPORT D'ETUDE : T 265/4544 du 30 Juin 1994

ALKAPHARM

Toxicité orale aiguë chez la Souris
de la préparation

Alkazyme poudre – Lot 403161

(Epreuve limite)

BG/CP

Ce rapport contient 8 pages

Z.I. - 33295 BLANQUEFORT - FRANCE
TÉLEX 550 717 - FAX 56 95 05 22
TÉL. 56 35 02 25

1, rue Massue - 94300 VINCENNES - FRANCE
FAX (1) 48 08 62 31
TÉL. (1) 43 65 03 03

S.A. AU CAPITAL DE 2 400 000 FRS - RC 70B70 BORDEAUX - SIRET 470 200 700 00016 - FR 79470200700

EVIC-TOX DIVISION EXPERIMENTATION ANIMALE - EVIC-DOC DIVISION BIBLIOGRAPHIQUE - EVIC-BIO DIVISION BIOTECHNIQUE - EVIC-IDEC DIVISION EXPLORATION CLINIQUE

D:\ALKAZYME Colombia\2020\06

Laboratoire accrédité par le
Réseau National d'Essais sous le
n° 29.85/01

Toxicité orale aiguë chez la Souris de la préparation

Alkazyme poudre – Lot 403161

(Epreuve limite)

Référence de l'étude	: T 265/4544
Protocole utilisé	: ligne directrice 401 de l'OCDE
Produit étudié	: Alkazyme poudre – Lot 403161
Commanditaire	: ALKAPHARM
Moniteur de l'étude	: S. MERCIER
Lieu de réalisation de l'étude	: EVIC CEBA – 33295 BLANQUEFORT
Technicien responsable	: Martine MIERMON 05/07/94
Directeur de l'étude	: Philippe DUFOUR 04/07/94
Assurance Qualité	: Patrick GOMOND p/o 05/07/94
Directeur du Laboratoire d'Essai	: Philippe MASSON
Dates d'essai	
Début d'étude	: 18 Mai 1994
Fin d'étude	: 1er Juin 1994

RESULTAT ET CONCLUSION

La préparation **Alkazyme poudre – Lot 403161** administrée par voie orale chez la Souris mâle et femelle à la dose unique de 2000 mg/kg :

- n'entraîne aucune mortalité,
- n'a pas d'effet toxique sur le comportement et les fonctions végétatives des animaux,
- ne modifie pas leur croissance pondérale,
- ne provoque pas d'altérations organiques ou tissulaires visibles macroscopiquement.

Dans les conditions expérimentales adoptées, la DL0 par voie orale de la préparation étudiée est supérieure à 2000 mg/kg chez la Souris.

Selon la directive 67/548/CEE, la préparation testée doit être classée parmi les substances **non dangereuses** en cas d'ingestion.

Le rapport d'étude ne concerne que l'objet soumis à l'essai.

1. INTRODUCTION

. But de l'étude

Evaluer les propriétés toxiques d'une substance ou d'une préparation administrée par voie orale chez la Souris en une dose unique.

. Protocole utilisé

L'essai est réalisé selon la ligne directrice 401 de l'OCDE.

2. PRODUIT ETUDIE

- Dénomination, référence : Alkazyme poudre - Lot 403161
- Aspect : poudre blanche
- Quantité reçue, conditionnement : 100 g, pot en plastique
- Date de réception : 10 Mai 1994
- Numéro d'enregistrement au Laboratoire : 4544
- Fiche de renseignement : non communiquée
- Contrôle de l'homogénéité : non exigé pour les études inférieures à 28 jours
- Stockage : à température ambiante, à l'abri de la lumière
- Archivage : échantillon de produit conservé pendant 10 ans. Le rapport final et les données brutes de l'essai sont archivés dans la salle réservée à cet effet, dans le Laboratoire d'Essai.
- Véhicule utilisé : eau distillée (Méram Lot 43209)

3. MODE OPERATOIRE

. Système réactif

- Espèce, souche, origine : Souris NMRI Han EOPS, animalerie de production EVIC-CEBA (33295 - BLANQUEFORT, France).
- Nombre, sexe : 10, 5 mâles et 5 femelles
- Age, poids : 5 semaines environ, entre 19 et 21 g

- Stabulation, nourriture : 5 par sexe et par cage en polypropylène de dimension 46,5 x 15 x 14 cm. Maintenance environnementale conforme aux exigences de la directive 86/609/CEE. Aliment granulé UAR A04-10 (91360 - EPINAY SUR ORGE, FRANCE).

. Conditions d'utilisation du produit

Les animaux sont mis à jeun 4 heures avant le traitement. Ils reçoivent par gavage, en fonction de leur poids, la substance à tester diluée dans l'eau distillée à la dose unique de 2000 mg/kg sous un volume de 20 ml/kg (soit une concentration de 100 mg/ml). La préparation est maintenue sous agitation magnétique pendant les traitements.

. Raison du choix de la voie d'administration

Le traitement par voie orale est la méthode de choix pour estimer les effets défavorables résultant d'une ingestion accidentelle chez l'Homme.

. Observations

Les animaux sont gardés en observation 14 jours après le traitement.

Examens cliniques

- une observation clinique est pratiquée au moins une fois par jour afin de noter les modifications de l'aspect, du comportement et des fonctions végétatives des animaux traités. Une observation clinique individuelle est réalisée 1 heure après le traitement (tableau 1). Ces examens sont poursuivis au cours des 5 heures suivantes, puis quotidiennement jusqu'à la fin de l'essai.

- le poids corporel de chaque animal est déterminé immédiatement avant le traitement (J1) puis 3, 7 et 14 jours après l'administration de la substance à tester.

Examens autopsiques

A la fin de la période d'observation, tous les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale puis autopsiés. Toutes les altérations pathologiques macroscopiques sont enregistrées.
Aucun prélèvement tissulaire n'est effectué.

. Interprétation des résultats

Conformément à la directive 67/548/CEE, la substance testée n'appartient pas à la classe des substances dangereuses par ingestion si la DL50 est supérieure à 2000 mg/kg.

4. RESULTATS ET CONCLUSION

Examens cliniques

. Observations cliniques

Aucune mortalité n'a été constatée.
Aucune modification de l'aspect, du comportement et des fonctions végétatives n'a été observée chez tous les animaux 1 heure après le traitement (tableau 1) puis au cours des 5 heures suivantes. Les examens quotidiens renouvelés pendant la période d'observation n'ont permis de noter aucune altération de l'état général et du comportement des animaux.

. Evolution pondérale (tableaux 2.m et 2.f)

L'évolution pondérale individuelle de tous les animaux mâles et femelles a été normale et régulière. Le gain pondéral moyen après 14 jours d'observation est apparu nettement positif et satisfaisant pour cette espèce.

Examens autopsiques (tableaux 2.m et 2.f)

L'autopsie de tous les animaux, 14 jours après le traitement n'a mis en évidence aucune lésion organique ou tissulaire.

Dans les conditions expérimentales adoptées, la DL0 par voie orale de la préparation **Alkazyme poudre – Lot 403161** chez la Souris mâle et femelle est **supérieure** à 2000 mg/kg.

L'interprétation des résultats faite selon la directive 67/548/CEE permet de classer la préparation testée parmi les substances **non dangereuses** en cas d'ingestion.

ALKAZYME poudre – lot 403161

N° étude : T 265 / 4544
J1 : 18.05.94

Administration : VOIE ORALE
DOSE : 2000 mg/Kg

Espèce : SOURIS

Sexe : Mâle et Femelle

Opérateur : M.M

OBSERVATIONS CLINIQUES

	MALES				
N° animaux	0689	0690	0691	0692	0693
Activité Spontanée	N	N	N	N	N
Reflexe de Preyer (bruit)	N	N	N	N	N
Effet respiratoire	N	N	N	N	N
Convulsions	0	0	0	0	0
Tremblements	0	0	0	0	0
Température	N	N	N	N	N
Tonus musculaire	N	N	N	N	N
Ptose palpébrale	N	N	N	N	N
Mydriase	N	N	N	N	N
Salivation / Larmes	N	N	N	N	N
Reflexe de Retournement	N	N	N	N	N
Piloérection	N	N	N	N	N

	FEMELLES				
N° animaux	0694	0695	0696	0697	0698
Activité Spontanée	N	N	N	N	N
Reflexe de Preyer (bruit)	N	N	N	N	N
Effet respiratoire	N	N	N	N	N
Convulsions	0	0	0	0	0
Tremblements	0	0	0	0	0
Température	N	N	N	N	N
Tonus musculaire	N	N	N	N	N
Ptose palpébrale	N	N	N	N	N
Mydriase	N	N	N	N	N
Salivation / Larmes	N	N	N	N	N
Reflexe de Retournement	N	N	N	N	N
Piloérection	N	N	N	N	N

LEGENDE : N : Normal 0 : Absence

Tableau 1

ALKAZYME poudre – lot 403161

N° étude : T 265 / 4544

TABLEAU : 2.m

J1 : 18.05.94

Espèce : SOURIS

Sexe : Mâle

DOSE : 2000 mg/Kg – VOIE ORALE

Opérateur : M.M

EVOLUTION PONDERALE (en g)

N° animaux	0689	0690	0691	0692	0693	Moyenne	Ecart-T.
J1	21,0	21,0	20,0	20,0	19,0	20,2	0,8
J4	26,0	27,0	21,5	23,0	25,0	24,5	2,2
J8	29,0	30,0	25,5	25,5	28,5	27,7	2,1
J15	34,0	35,5	30,5	32,0	35,0	33,4	2,1
VARIATION J15–J1	13,0	14,5	10,5	12,0	16,0	13,2	2,1

EXAMEN AUTOPSIQUE

MORTALITE	N° ax	0689	0690	0691	0692	0693	Légende
	Rang	J15	J15	J15	J15	J15	
	Cause	T	T	T	T	T	T : Sacrifice
OBSERVATIONS		R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S : Rien à signaler

AUTRES OBSERVATIONS : /

ALKAZYME poudre – lot 403161

N° étude : T 265 / 4544 TABLEAU : 2.f

J1 : 18.05.94 Espèce : SOURIS Sexe : Femelle

DOSE : 2000 mg/Kg – VOIE ORALE Opérateur : M.M

EVOLUTION PONDERALE (en g)

N° animaux	0694	0695	0696	0697	0698	Moyenne	Ecart-T.
J1	20,0	21,0	20,0	20,0	21,0	20,4	0,5
J4	23,0	24,0	23,0	21,5	23,5	23,0	0,9
J8	25,5	28,0	25,5	23,5	25,5	25,6	1,6
J15	29,0	31,5	30,0	28,0	30,0	29,7	1,3
VARIATION J15-J1	9,0	10,5	10,0	8,0	9,0	9,3	1,0

EXAMEN AUTOPSIQUE

MORTALITE	N° ax	0694	0695	0696	0697	0698	Légende
	Rang	J15	J15	J15	J15	J15	
	Cause	T	T	T	T	T	T : Sacrifice
OBSERVATIONS		R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S : Rien à signaler

AUTRES OBSERVATIONS : /

EVIC-CEBA
LABORATOIRE DE RECHERCHE ET D'EXPERIMENTATION

RAPPORT D'ETUDE : T 266/4544 du 1er Juillet 1994

ALKAPHARM

Toxicité orale aiguë chez la Souris
de la préparation

Alkazyme poudre – Lot 403161 à 0,5 %
dans l'eau distillée

(Epreuve limite)

BG/CP

Ce rapport contient 8 pages

Z.I. - 33295 BLANQUEFORT - FRANCE
TÉLEX 550 717 - FAX 56 95 05 22
TÉL. 56 35 02 25

1, rue Massue - 94300 VINCENNES - FRANCE
FAX (1) 48 08 62 31
TÉL. (1) 43 65 03 03

S.A. AU CAPITAL DE 2 400 000 FRS - RC 70B70 BORDEAUX - SIRET 470 200 700 00016 - FR 79470200700

EVIC-TOX DIVISION EXPERIMENTATION ANIMALE
EVIC-DOC DIVISION BIBLIOGRAPHIQUE
EVIC-BIO DIVISION BIOTECHNIQUE
EVIC-IDEC DIVISION EXPLORATION CLINIQUE

Laboratoire accrédité par le
Réseau National d'Essais sous le
n° 29.85/01

Toxicité orale aiguë chez la Souris de la préparation

Alkazyme poudre – Lot 403161 à 0,5 % dans l'eau distillée
(Epreuve limite)

Référence de l'étude	: T 266/4544
Protocole utilisé	: ligne directrice 401 de l'OCDE
Produit étudié	: Alkazyme poudre à 0,5 % dans l'eau distillée (conditions normales d'utilisation)
Commanditaire	: ALKAPHARM
Moniteur de l'étude	: S. MERCIER
Lieu de réalisation de l'étude	: EVIC CEBA – 33295 BLANQUEFORT
Technicien responsable	: Martine MIERMON 05/07/94
Directeur de l'étude	: Philippe DUFOUR 04/07/94
Assurance Qualité	: Patrick GOMOND 05/07/94
Directeur du Laboratoire d'Essai	: Philippe MASSON
Dates d'essai	
Début d'étude	: 24 Mai 1994
Fin d'étude	: 7 Juin 1994

RESULTAT ET CONCLUSION

La préparation **Alkazyme poudre – Lot 403161 à 0,5 % dans l'eau distillée** administrée par voie orale chez la Souris mâle et femelle à la dose maximale unique de 40 g/kg :

- n'entraîne aucune mortalité,
- n'a pas d'effet toxique sur le comportement et les fonctions végétatives des animaux,
- ne modifie pas leur croissance pondérale,
- ne provoque pas d'altérations organiques ou tissulaires visibles macroscopiquement.

Dans les conditions expérimentales adoptées, la DL0 par voie orale de la préparation étudiée est supérieure à 40 g/kg chez la Souris.

Selon la directive 67/548/CEE, la préparation testée doit être classée parmi les substances **non dangereuses** en cas d'ingestion.

Le rapport d'étude ne concerne que l'objet soumis à l'essai.

1. INTRODUCTION

. But de l'étude

Evaluer les propriétés toxiques d'une substance ou d'une préparation administrée par voie orale chez la Souris en une dose unique.

. Protocole utilisé

L'essai est réalisé selon la ligne directrice 401 de l'OCDE.

2. PRODUIT ETUDIE

- Dénomination, référence : Alkazyme poudre – Lot 403161
- Aspect : poudre blanche
- Quantité reçue, conditionnement : 100 g, pot en plastique
- Date de réception : 10 Mai 1994
- Numéro d'enregistrement au Laboratoire : 4544
- Fiche de renseignement : non communiquée
- Contrôle de l'homogénéité : non exigé pour les études inférieures à 28 jours
- Stockage : à température ambiante, à l'abri de la lumière
- Archivage : échantillon de produit conservé pendant 10 ans. Le rapport final et les données brutes de l'essai sont archivés dans la salle réservée à cet effet, dans le Laboratoire d'Essai.
- Préparation testée : Alkazyme poudre en solution à 0,5 % dans l'eau distillée (conditions normales d'utilisation)
- Véhicule utilisé : eau distillée (Méram Lot 43209)

3. MODE OPERATOIRE

. Système réactif

- Espèce, souche, origine : Souris NMRI Han EOPS, animalerie de production EVIC-CEBA (33295 – BLANQUEFORT, France).
- Nombre, sexe : 10, 5 mâles et 5 femelles
- Age, poids : 5 semaines environ, entre 19 et 21,5 g

- Stabulation, nourriture : 5 par sexe et par cage en polypropylène de dimension 46,5 x 15 x 14 cm. Maintenance environnementale conforme aux exigences de la directive 86/609/CEE. Aliment granulé UAR A04-10 (91360 - EPINAY SUR ORGE, FRANCE).

. Conditions d'utilisation du produit

Les animaux sont mis à jeun 4 heures avant le traitement. Ils reçoivent par gavage, en fonction de leur poids, la substance à tester diluée à 0,5 % dans l'eau distillée (conditions normales d'utilisation) à la dose unique de 40 g/kg sous un volume de 40 ml/kg (soit une concentration de 1 g/ml). La préparation est maintenue sous agitation magnétique pendant les traitements.
Le volume administré est admis comme étant le maximum pouvant être administré par voie orale chez la Souris.

. Raison du choix de la voie d'administration

Le traitement par voie orale est la méthode de choix pour estimer les effets défavorables résultant d'une ingestion accidentelle chez l'Homme.

. Observations

Les animaux sont gardés en observation 14 jours après le traitement.

Examens cliniques

- une observation clinique est pratiquée au moins une fois par jour afin de noter les modifications de l'aspect, du comportement et des fonctions végétatives des animaux traités. Une observation clinique individuelle est réalisée 1 heure après le traitement (tableau 1). Ces examens sont poursuivis au cours des 5 heures suivantes, puis quotidiennement jusqu'à la fin de l'essai.

- le poids corporel de chaque animal est déterminé immédiatement avant le traitement (J1) puis 3, 7 et 14 jours après l'administration de la substance à tester.

Examens autopsiques

A la fin de la période d'observation, tous les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale puis autopsiés. Toutes les altérations pathologiques macroscopiques sont enregistrées.
Aucun prélèvement tissulaire n'est effectué.

. Interprétation des résultats

4. RESULTATS ET CONCLUSION

Examens cliniques

. Observations cliniques

Aucune mortalité n'a été constatée.
Aucune modification de l'aspect, du comportement et des fonctions végétatives n'a été observée chez tous les animaux 1 heure après le traitement (tableau 1) puis au cours des 5 heures suivantes. Les examens quotidiens renouvelés pendant la période d'observation n'ont permis de noter aucune altération de l'état général et du comportement des animaux.

. Evolution pondérale (tableaux 2.m et 2.f)

L'évolution pondérale individuelle de tous les animaux mâles et femelles a été normale et régulière. Le gain pondéral moyen après 14 jours d'observation est apparu nettement positif et satisfaisant pour cette espèce.

Examens autopsiques (tableaux 2.m et 2.f)

L'autopsie de tous les animaux, 14 jours après le traitement n'a mis en évidence aucune lésion organique ou tissulaire.

Dans les conditions expérimentales adoptées, la DL0 par voie orale de la préparation **Alkazyme poudre – Lot 403161 à 0,5 % dans l'eau distillée** chez la Souris mâle et femelle est **supérieure** à 40 g/kg.

L'interprétation des résultats faite selon la directive 67/548/CEE permet de classer la préparation testée parmi les substances **non dangereuses** en cas d'ingestion.

ALKAZYME poudre – lot 403161 (solution à 0,5%)

N° étude : T 266 / 4544
J1 : 24.05.94

Administration : VOIE ORALE
DOSE : 40g/Kg (soit 40 ml/kg)

Espèce : SOURIS

Sexe : Mâle et Femelle

Opérateur : M.M

OBSERVATIONS CLINIQUES

	MALES				
N° animaux	0809	0810	0811	0812	0813
Activité Spontanée	N	N	N	N	N
Reflexe de Preyer (bruit)	N	N	N	N	N
Effet respiratoire	N	N	N	N	N
Convulsions	0	0	0	0	0
Tremblements	0	0	0	0	0
Température	N	N	N	N	N
Tonus musculaire	N	N	N	N	N
Ptose palpébrale	N	N	N	N	N
Mydriase	N	N	N	N	N
Salivation / Larmes	N	N	N	N	N
Reflexe de Retournement	N	N	N	N	N
Piloérection	N	N	N	N	N

	FEMELLES				
N° animaux	0814	0815	0816	0817	0818
Activité Spontanée	N	N	N	N	N
Reflexe de Preyer (bruit)	N	N	N	N	N
Effet respiratoire	N	N	N	N	N
Convulsions	0	0	0	0	0
Tremblements	0	0	0	0	0
Température	N	N	N	N	N
Tonus musculaire	N	N	N	N	N
Ptose palpébrale	N	N	N	N	N
Mydriase	N	N	N	N	N
Salivation / Larmes	N	N	N	N	N
Reflexe de Retournement	N	N	N	N	N
Piloérection	N	N	N	N	N

LEGENDE : N : Normal 0 : Absence

Tableau 1

ALKAZYME poudre – lot 403161 (solution à 0,5%)

N° étude : T 266 / 4544
J1 : 24.05.94

Espèce : SOURIS

Sexe : Mâle

Administration : VOIE ORALE
DOSE : 40 g/Kg (soit 40 ml/Kg)

Opérateur : M.M

EVOLUTION PONDERALE (en g)

N° animaux	0809	0810	0811	0812	0813	Moyenne	Ecart-T.
J1	19,0	21,5	20,0	19,5	19,0	19,8	1,0
J4	24,0	25,0	26,5	22,0	22,5	24,0	1,8
J8	27,0	28,5	29,0	25,5	26,0	27,2	1,5
J15	34,0	35,5	37,0	32,5	31,0	34,0	2,4
VARIATION J15–J1	15,0	14,0	17,0	13,0	12,0	14,2	1,9

EXAMEN AUTOPSIQUE

MORTALITE	N° ax	0809	0810	0811	0812	0813	Légende
	Rang	J15	J15	J15	J15	J15	
	Cause	T	T	T	T	T	T : Sacrifice
OBSERVATIONS		R.A.S	R.A.S	RA.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S : Rien à signaler

AUTRES OBSERVATIONS : /

Tableau 2.m

ALKAZYME poudre – lot 403161 (solution à 0,5%)

N° étude : T 266 / 4544
J1 : 24.05.94

Administration : VOIE ORALE
DOSE : 40 g/Kg (soit 40 ml/Kg)

Espèce : SOURIS

Sexe : Femelle

Opérateur : M.M

EVOLUTION PONDERALE (en g)

N° animaux	0814	0815	0816	0817	0818	Moyenne	Ecart-T.
J1	21,0	20,0	19,5	20,5	21,5	20,5	0,8
J4	22,0	22,5	20,5	23,0	24,0	22,4	1,3
J8	24,0	24,5	22,5	25,0	26,5	24,5	1,5
J15	28,0	27,5	26,5	29,0	30,0	28,2	1,4
VARIATION J15–J1	7,0	7,5	7,0	8,5	8,5	7,7	0,8

EXAMEN AUTOPSIQUE

MORTALITE	N° ax	0814	0815	0816	0817	0818	Légende
	Rang	J15	J15	J15	J15	J15	
	Cause	T	T	T	T	T	T : Sacrifice
OBSERVATIONS		R.A.S	R.A.S	RA.S	R.A.S	R.A.S	R.A.S : Rien à signaler

AUTRES OBSERVATIONS : /

Tableau 2.f

Study Title

Acute Inhalation Toxicity Test with **ALKAZYME** in Rats

(*Rattus norvegicus*)

Reconhecimento BPL

BPL 0003

Reference Methodology

Organisation for Economic Co-operation and Development-OECD, Guideline for the Testing of Chemicals Section 4: Health Effects, 403, 2009.

Study Director

Thiago Gomes Ferreira

Study Concluded On

13/Mar/2014

Performing Laboratory

BIOAGRI Laboratórios

Fazenda Lagoa Bonita, Chácara 13

Caixa Postal: 08287 – Planaltina/DF - 73310-970 - Brazil

Phone: + 55 (61) 3489-9100 / Fax: + 55 (61) 3489-9149

E-mail: bioagri@bioagri.com.br

www.bioagri.com.br

Sponsor

ALKAPHARM

Parc Biocitech

102 avenue Gaston Roussel

93230 – Romainville (France)

Final Report

RF – 14706.309.080.13

Final Report Approval

I declare that were guaranteed the necessary conditions to the study described in this Final Report was performed according to the Principles of Good Laboratory Practice of the Rule # NIT-DICLA-035-Sep/11 – INMETRO (*Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia)* [4] and OECD Principles of Good Laboratory Practice (1998) [7].

13 / MAR / 2013

Alexandre Quesada
Test Facility Manager
Phone: +55 (61) 3489-9100

dd mmm yyyy

Study Compliance Statement

I declare that the study described in this Final Report was performed under my supervision, according to the Study Plan and procedures described in the Guideline 403 of Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2009) [6] and following the Principles of Good Laboratory Practice of the Rule # NIT-DICLA-035-Sep/11 - INMETRO (*Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia*) [4] and OECD Principles of Good Laboratory Practice (1998) [7].

This report represents an accurate and true recording of the results obtained.

Thiago Gomes

13 / MAR / 2014

Thiago Gomes Ferreira

dd mmm yyyy

Study Director

Phone: +55 (61) 3489-9100

Quality Assurance Statement

Study Title

Acute Inhalation Toxicity Test with **ALKAZYME** in Rats (*Rattus norvegicus*)

This Final Report was reviewed by the Quality Assurance – BIOAGRI Laboratórios. The dates and phases of audits in the procedure are given below:

Audit		***Information Report Date***	
Date	***Phase***	***Study Director***	***Test Facility Manager***
08/Jan/2014	Study Plan	08/Jan/2014	08/Jan/2014
19/Dec/2013	Test system selection IAR – 1406/13	26/Dec/2013	26/Dec/2013
26/Dec/2013	Test system acclimation and randomization IAR – 1426/13	26/Dec/2013	26/Dec/2013
26/Dec/2013	Test item preparation and application IAR – 1440/13	30/Dec/2013	30/Dec/2013
27/Dec/2013	Clinical Examination IAR –1433/13	27/Dec/2013	27/Dec/2013
27/Dec/2013	Body Weight IAR –1432/13	27/Dec/2013	27/Dec/2013
27/Dec/2013	Necropsy IAR – 1435/13	27/Dec/2013	27/Dec/2013
10/Mar/2014	Final Report Draft	10/Mar/2014	10/Mar/2014
13/Mar/2014	Final Report	13/Mar/2014	13/Mar/2014

A process audit was performed on the phases described above, according to the **Internal Audit Report (IAR)**.

The results and observations presented in this Final Report are an accurate representation of the raw data generated during the conduct of this study. Therefore, all raw data generated during the study performing were inspected, as well as amendments to the Study Plan.

13/ Mar/ 2014

dd mmm yyyy

Carla Cristina Alves da Silva
Quality Assurance
Phone: +55 (61) 3489-9100

Index

Page #

Study Compliance Statement 2
Final Report Approval 3
Quality Assurance Statement 4
Index 5
Tables Index 6
Figure Index 6
INMETRO GLP Accreditation Certificate 7
Summary 8
1. General Information 9
1.1. Dates 9
1.2. Technical Staff 9
2. Definitions 9
3. Objective 9
4. Materials and Methods 10
4.1. Test Item Information 10
4.2. Preparation of the Test Item 10
4.3. Test System 10
4.3.1. Animal Husbandry 11
4.3.2. Animal Welfare Compliance Statement 12
4.4. Experimental Design and Procedures 12
4.5. Statistical Method 13
5. Study Plan Deviation 13
6. Records to be Maintained 14
7. Results 14
7.1. Exposure Conditions 14
7.2. Test Atmosphere Characterization 15
7.2.1. Mean Actual Concentration 15
7.2.2. Aerodynamic Particle-Size Distribution 16
7.3. Effects on the Test System 16
7.3.1. Mortality 16
7.3.2. Clinical Signs 16
7.3.3. Gross Necropsy 16
7.3.4. Histopathology 16
7.3.5. Body Weight 16

8. Discussion 18
9. Conclusion 18
10. References 19
11. Inhalation System Layout 20
13. Appendix 21
13.1. Aerodynamic Particle-Size Distribution 21
13.2. Individual Clinical Signs 22
13.3. Individual Macroscopic Findings 23
13.4. Individual Body Weights and Age 24

Tables Index

Table 1. Temperature and humidity during the exposure 14
Table 2. Total airflow (primary + secondary) in the chamber. 14
Table 3. Mean actual concentration of **ALKAZYME** on the aerosol 15
Table 4. Mean body weight (g), standard deviation, and mean body weight gain (%) per group and weighing day after airborne exposure to **ALKAZYME** 17
Table 5. Aerodynamic particle-size distribution. 21
Table 6. Clinical signs and death time observed after airborne exposure to **ALKAZYME** (males) 22
Table 7. Clinical signs and death time observed after airborne exposure to **ALKAZYME** (females) 22
Table 8. Macroscopic findings after airborne exposure to **ALKAZYME** (males) 23
Table 9. Macroscopic findings after airborne exposure to **ALKAZYME** (females) 23
Table 10. Individual body weights (g) and age (weeks) of the exposed rats to **ALKAZYME** (males) 24
Table 11. Individual body weights (g) and age (weeks) of the exposed rats to **ALKAZYME** (females) 24

Figure Index

Figure 1. Inhalation system during aerosolization of solid test item. 20

INMETRO GLP Accreditation Certificate

Federal Republic of Brazil
Ministry of Development, Industry and Foreign Trade
National Institute of Metrology, Quality and Technology - INMETRO

General Coordination for Accreditation
Recognition of Compliance with the OECD Principles on Good Laboratory Practice

Statement of Compliance No. GLP 0003 **Initial Recognition: October 10th, 2000**

BIOAGRI PHARMA LTDA. – DF
BIOAGRI LABORATÓRIO LTDA. – DF
FAZENDA LAGOA BONITA – CHÁCARA, 13
CONDOMÍNIO ESTÂNCIA – PLANALTINA – DF – BRAZIL

The test facility was inspected within the Brazilian GLP Monitoring Program of General Coordination for Accreditation of INMETRO and was considered in compliance with the OECD Principles on Good Laboratory Practice, for the conduct of non-clinical health and environmental safety studies, in the scope below:

Areas of Expertise	***Categories of Test Items***
Toxicity studies, Environmental toxicity studies on aquatic and terrestrial organisms	*- Pesticides, Their Components and Suchlike;* *- Pharmaceutical Products;* *- Cosmetics;* *- Wood Preservative;* *- Veterinary Products;* *- Disinfectants;* *- Industrial Chemical Products*

Note: Categories of test items "pesticides" and "industrial chemical" are covered by Brazil´s full adherence to the OECD Council Acts related to the Mutual Acceptance of Data (MAD) on Good Laboratory Practice.

Marcos Aurélio Lima de Oliveira
General Coordinator for Accreditation

Issue: September 13th, 2012 Expiration date: October 11th, 2016

Cópia reduzida e digitalizada do documento original
Reduced and scanned copy of original document

Summary

The acute inhalation toxicity test in rats (*Rattus norvegicus*, Wistar Hannover) was carried out in order to study the possible adverse effects observed after airborne exposure to **ALKAZYME**, according to the OECD Guideline 403, 2009.

One group of rats (three/sex) was nose-only exposed to the test item aerosolized in its ground and sieved solid form for a 4-hour exposure period, using a total airflow of 10 L/min. The analysis of the aerodynamic particle-size distribution demonstrated that the Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) and the Geometric Standard Deviation (GSD) were 3.39 and 3.52 µm and 2.88 and 2.59, respectively, indicating that at least 50% of the mass collected from the aerosol generated was within the respirable diameter (< 4 µm). The mean actual concentration tested was 0.065 mg/L.

Neither compound-related death nor compound-related macroscopic finding on gross necropsy was observed in this study.

No compound-related clinical sign was observed in this study.

The mean body weight increased for both sexes in all post-exposure weighings, except in the first post-exposure weighings for the males. All animals exceeded their initial body weight at the end of the observation period of 14 days.

Therefore, the combined (males and females) median lethal concentration in a 4-hour nose-only exposure period (4-h LC_{50}) to **ALKAZYME** inhaled by Wistar Hannover rats was greater than 0.065 mg/L. When tested at the maximum attainable concentration in the chamber atmosphere, the test item **ALKAZYME** induced no acute inhalation toxicity in the Wistar Hannover rats in a 4-hour nose-only exposure period.

1. General Information

1.1. Dates

Study initiation:	13/Jan/2014
Experimental Phase Initiation:	23/Jan/2014
Experimental Phase Conclusion:	04/Mar/2014
Final Report Draft Conclusion:	12/Mar/2014
Final Report Conclusion:	13/Mar/2014

1.2. Technical Staff

Study Director	Thiago Gomes Ferreira
Randomization	Cleison Santana Ribeiro
Test item Preparation and Application	Cleison Santana Ribeiro
	José Paulo Barbosa da Cruz
Animal Weighing	Cleison Santana Ribeiro
	Benedito Alves Abrantes Júnior
Observations of the Test System	Robert Hernández Ferrá
Necropsy	Robert Hernández Ferrá
Raw Data Conference	Thiago Gomes Ferreira

2. Definitions

1. **Median Lethal Concentration (LC_{50}):** It is a statistically derived estimate of a concentration of a substance that can be expected to cause death during exposure period or within observation period to fifty percent of the rats exposed. The LC_{50} value is expressed as weight of substance per standard volume of air (mg/L);
2. **Acute Inhalation Toxicity:** It is the total adverse effects caused by a substance following a single uninterrupted airborne exposure through inhalation route over a short period of time;
3. **Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD):** Is the median aerodynamic diameter, starting from which 50% of the collected mass have the diameter greater than the value calculated, while the other 50% of the collected mass have the diameter lower than the value calculated;
4. **Geometric Standard Deviation (GSD):** Is the calculated deviation from the MMAD.

3. Objective

The objective of this study was to evaluate the inhalation toxicity of **ALKAZYME** which is the relationship between a short-term airborne exposure to the aerosolized compound in a determined concentration and its exposure-related adverse effects. It also provides information on mechanisms of toxicity and on health hazards occurring after airborne exposure to this compound.

This test followed the Guideline for the Testing of Chemicals of the Organisation for Economic Co-operation and Development – OECD, Section 4: Health Effects, 403, 2009 [6] and was conducted in accordance with the BIOAGRI Laboratórios' Standard Operating Procedure **SOP–M 008**, **Revision 25**.

4. Materials and Methods

4.1. Test Item Information

1. **Sponsor**	ALKAPHARM
2. **Test substance**	**ALKAZYME**
3. **Declared composition**	Sodium Carbonate (25 <= x % < 50) Alcohol Ethoxylate C9 C11 8 OE (2.5 <= x % < 10) Didecyl Dimethyl Ammonium Chloride (2.5 <= x % < 10) Propan-2-ol (0 <= x % < 2.5) Subtilisin (0 <= x % < 2.5)
4. **CAS RN**	497-19-8 (Sodium Carbonate) 68439-46-3 (Alcohol Ethoxylate C9 C11 8 OE) 7173-51-5 (Didecyl Dimethyl Ammonium Chloride) 67-63-0 (Propan-2-ol) 9014-01-1 (Subtilisin)
5. **Batch nº**	2013.07.10.44
6. **BIOAGRI code**	DQM- 0988/13
7. **Received on**	23/Sep/2013
8. **Manufacture date**	Jul/2013
9. **Expiry date**	Jul/2016
10. **Physical state**	Solid
11. **Manufacturer**	ALKAPHARM
12. **Manufacturer Address**	Parc Biocitech 102 avenue Gaston Roussel 93230 – Romainville (France)

4.2. Preparation of the Test Item

The test item was aerosolized non-diluted and in its solid form. The test item was ground for five minutes, sieved (60# mesh) and stored in a desiccator with silica gel for 24 hours in order to decrease the particle-size and to increase its respirability.

4.3. Test System

1. **Species:** Rats (*Rattus norvegicus)*;
2. **Strain:** Wistar Hannover;
3. **Justification of test system selection:** Currently, no alternative, in vitro or otherwise, to the use of live animals is accepted by the relevant supervisory government agencies. Rat is the

model recommended by regulatory agencies for the assessment of acute inhalation toxicity;

4. **Source:** Healthy young adults were supplied by BIOAGRI's (DF) rearing house;

5. **Body weight:** Was measured on the exposure day prior to the exposure (day 0), on the first, third, seventh and fourteenth post-exposure days. No rat weighed less than or exceeded the acceptable 20% variation from the mean body weight for each sex of any exposed animal of the same age on exposure day (Tables 10 and 11, page 24);

6. **Age:** Males were nine weeks old and females were ten weeks old on the exposure day;

7. **Sex:** Equal number of males and females (nulliparous and non-pregnant) was used;

8. **Number:** One group of six animals (three/sex/cage) was used. One additional rat/sex was acclimated. The number of animals for this study was considered to be the minimum necessary to produce interpretable and scientifically significant results;

9. **Identification:** Each selected rat was exclusively identified by a number mark on its tail with a non-toxic permanent pen and after randomization, with an adequate software [1], an additional mark was done with a 2% picric acid solution;

10. **Cages:** Cage identification cards were prepared identifying the study in full details;

11. **Acclimation:** Clinically healthy rats were acclimated to the animal house facilities for six days prior to exposure. Before the application, the selected rats were acclimated to the nose-only exposure tube for fifteen minutes. All the animals appeared to be acclimated.

4.3.1. Animal Husbandry

1. **Housing:** 41x34x20 cm polypropylene cages with autoclaved wood shavings and stainless steel mesh lids containing three rats of same sex per cage on the experimental phase were used. The wood shaving batches are regularly assayed by BIOAGRI to verify the presence of chemical and environmental contaminants and the results found are available for inspection;
2. **Environmental conditions:** During the observation period were automatically maintained in a temperature from 19 to 22°C, a relative humidity from 37 to 69.1%, 10 to 20 air changes in the room per hour [2] [3] and photoperiod of 12 hours dark and 12 hours light. The temperature and relative humidity were measured by Carrier ComfortVIEW System;
3. **Diet and water:** Pelleted and autoclaved commercial diet for rats *(Supralab – Alisul Alimentos S.A.)*, and filtered potable water (provided by *CAESB - Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal*) were available *ad libitum*. Samples of feed batches are regularly assayed for nutritional components and presence of environmental and chemical contaminants. Monitoring of drinking water for

contaminants is periodically conducted. Results of the diet and drinking water analyses are maintained by the testing laboratory and are available for inspection.

4.3.2. Animal Welfare Compliance Statement

This study was conducted in conformity with the applicable rules for animal welfare and humane use and care of laboratory animals. Whenever possible, procedures were designed to avoid or minimize discomfort, stress and pain to animals. The animal care procedures during this study were conducted in accordance with the principles of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [5].

4.4. Experimental Design and Procedures

1. **Vehicle:** The test item was aerosolized non-diluted;
2. **Exposure route justification:** Airborne inhalation simulates a potential route of human exposure and its assessment is recommended by regulatory agencies;
3. **Frequency and duration of exposure:** A single 4-hour exposure period;
4. **Exposure equipment:** The chamber used was a Jaeger Inhalation Chamber, Mark II with a Wright Dust Feeder integrated system coupled to a cyclone, with a big scraper and previously calibrated to a 6.48 RPM rotation. The source of air used came from a cylinder of compressed medicinal air prepared synthetically (21% of oxygen and 79% of nitrogen). The air eliminated was treated with a filter absolute model F – 771 K03 Trox and filter of activated carbon F – 760 Trox;
5. **Exposure principle:** Rats were exposed to the aerosolized test item in plexiglass nose-only tubes applying a direct-flow exposure principle. The total airflow (primary + secondary) in the chamber was 10 L/min. Considering that there are twelve exits in the chamber (6 to allocate the animals during the exposure, 2 to make the collects and 4 free), the dynamic flow was of approximately 833 mL/min/animal;
6. **Airflow:** The airflow rate was monitored continuously, through the use of an analogical flow meter and was recorded during the exposure. The total airflow did not show any variation (10 L/min.) (Table 2, page 14);
7. **Exposure principle justification:** Nose-only tubes were chosen to accommodate the rats' size and to allow the rat's tail to remain outside the tube, avoiding restrained-induced hyperthermia. This exposure principle is preferable compared to whole-body exposure because of scientific [9] and technical reasons - rapid attainment of steady-state concentrations, lower consumption of test substance and minimization of uptake by non-inhalation routes;
8. **Exposure conditions:** Were maintained in a temperature from 20.1 to 21.4°C and a relative humidity from 65 to 67%. Temperature and relative humidity were recorded four times during the exposure (Table 1, page 14). The equipment used to measure temperature and humidity was a

digital thermo-hygrometer TFA;

9. **Preliminary test:** Preliminary tests without animals were conducted to define the appropriate conditions to reach a test atmosphere with adequate particle-size;

10. **Limit test:** Since no compound-related mortality was observed on the maximum attainable concentration in the chamber atmosphere with adequate particle-size (0.065 mg/L), additional concentrations were not tested to determinate the Median Lethal Concentration (LC_{50});

11. **Mean actual concentration:** Three equally time-spaced air samples from the vicinity of the breathing zone were taken with an air sampling pump previously calibrated to a 0.500 L/min flow rate to collect the aerosol in filters (Millipore Field Monitor for contamination analysis, 0.8 µm micropore size) for five minutes. The filters were dried for at least three hours in a desiccator, and then, before and after sampling were weighed on an analytical scale;

12. **Aerodynamic particle-size distribution:** Two equally time-spaced air samples were taken from the vicinity of the breathing zone using an air sampling pump previously calibrated to a 0.500 L/min flow rate, to collect the aerosol in a Seven Stage Cascade Impactor (In-Tox, Albuquerque, New Mexico, U.S.A.) for five minutes. Before and after sampling, the stages were weighed;

13. **Clinical examinations:** Animals were observed frequently during the exposure period. Immediately after the exposure period, the rats were removed from the chamber, their heads carefully cleaned of any material and transferred to the animal house facility. Following exposure, two clinical observations were made during the first 24 hours and then daily during a fourteen-day observation period. The clinical observations were recorded systematically and individually;

14. **Euthanasia:** The animals acclimated, but not utilized in the study were euthanized in a carbon dioxide chamber and subjected to the exsanguination to ensure the death, discarded in biological garbage and then incinerated. All exposed rats were euthanized in a carbon dioxide chamber at the end of the observation period;

15. **Necropsy:** All exposed rats were necropsied, discarded in biological garbage and then incinerated. The presence or absence of any macroscopic finding observed on gross necropsy was recorded systematically and individually;

16. **Histopathology:** Microscopic examination of potential target organs was not considered necessary, due to the absence of compound-related clinical signs and macroscopic findings.

4.5. Statistical Method

Not applicable.

5. Study Plan Deviation

There was no deviation to the Study Plan.

6. Records to be Maintained

All original data and an original via of the Final Report were transferred to BIOAGRI Laboratórios' archive (Unit Planaltina-DF) and will be stored for a minimum of 10 years. After this period these materials will be disposed of according to BIOAGRI's Internal Procedure. The Sponsor will be contacted prior to the final disposal of these materials.

7. Results

7.1. Exposure Conditions

Table 1. Temperature and humidity during the exposure.

Time (min)	Temperature (°C)	Humidity (%)
30	20.1	65
90	20.2	65
150	20.8	65
210	21.4	67

Table 2. Total airflow (primary + secondary) in the chamber.

Time (min)	Primary (L/min)	Secondary (L/min)	Total (1^{ry} + 2^{ry})
00	10	0	10
30	10	0	10
60	10	0	10
90	10	0	10
120	10	0	10
150	10	0	10
180	10	0	10
210	10	0	10
Mean	10	0	10

7.2. Test Atmosphere Characterization

7.2.1. Mean Actual Concentration

The actual concentration of the test item in each sample was within the ± 20% interval from the mean actual concentration [6], indicating that the atmosphere was held stable over the 4-hour exposure period (Table 3).

Table 3. Mean actual concentration of **ALKAZYME** on the aerosol.

#	RPM[1]	Scraper	Weight of samples (mg)	Mean weight of samples (P) (mg)	Actual concentration (mg/L)	Mean actual concentration (mg/L)	SD	Mean ± 20%
1			0.18		0.072			0.052
2	6.48	Big	0.16	0.163	0.064	0.065	0.006	-
3			0.15		0.060			0.078

Values calculated using the Microsoft Excel 2010 ® Software and rounded to the third decimal place;
1: rotations per minute on the Wright Dust Feeder; **SD:** standard deviation; **#**: samples` number.
Sampling flow (F): 0,500 L/min; Sampling time (T): 5 minutes.

The mean actual concentration (Table 3) of **ALKAZYME** on the aerosol was calculated as described on the equation I below:

$$\text{(I) Mean Actual Concentration (mg/L)} = \frac{P(\text{mg})}{F(\text{L/min}) \times T(\text{min})} = \frac{0.163}{0.500 \times 5} = 0.065 \text{ mg/L}$$

P (mg) = mean weight of samples;

F (L/min) = sampling flow;

T (min) = sampling time.

7.2.2. Aerodynamic Particle-Size Distribution

The analysis of the aerodynamic particle-size distribution of samples from the breathing zone demonstrated that the Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) and the Geometric Standard Deviation (GSD) were 3.39 and 3.52 µm and 2.88 and 2.59, respectively, indicating that at least 50% of the mass collected from the aerosol generated was within the respirable diameter (< 4 µm) [6] [8] (Table 5, page 21).

7.3. Effects on the Test System

7.3.1. Mortality

No compound-related death was registered in this study.

7.3.2. Clinical Signs

No compound-related clinical sign was observed in this study. Individual data are displayed on Tables 6 and 7 (page 22).

7.3.3. Gross Necropsy

No compound-related macroscopic finding was registered in this study. Individual data are displayed on Tables 8 and 9 (page 23).

7.3.4. Histopathology

It was not considered necessary, due to the absence of compound-related clinical sign and macroscopic findings.

7.3.5. Body Weight

The mean body weight increased for both sexes in all post-exposure weighings, except in the first post-exposure weighings for the males (Table 4, page 17). All animals exceeded their initial body weight at the end of the observation period of 14 days. Individual body weights are displayed on Tables 10 and 11 (page 24).

Table 4. Mean body weight (g), standard deviation, and mean body weight gain (%) per group and weighing day after airborne exposure to **ALKAZYME.**

Days	Mean ± SD N	
	Males	**Females**
0	259.00 ± 3.00 3	173.00 ± 2.65 3
1	252.33 ± 1.53 3	179.67 ± 9.07 3
3	266.00 ± 2.00 3	186.00 ± 9.64 3
7	280.00 ± 2.65 3	188.67 ± 9.29 3
14	305.00 ± 2.65 3	195.00 ± 11.14 3
Day 0-1 (%)	-2.57	3.85
Day 1-3 (%)	5.42	3.53
Day 3-7 (%)	5.26	1.43
Day 7-14 (%)	8.93	3.36
Day 0-14 (%)	**17.76**	**12.72**

Mean, SD and gain values calculated using the Microsoft Excel 2010 ® software and rounded to the second decimal place; **SD:** standard deviation; **N:** number of live animals when body weight was measured.

8. Discussion

One group of rats (three/sex) was nose-only exposed to the test item aerosolized in its ground and sieved solid form for a 4-hour exposure period, using a total airflow of 10 L/min. The analysis of the aerodynamic particle-size distribution demonstrated that the Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) and the Geometric Standard Deviation (GSD) were 3.39 and 3.52 µm and 2.88 and 2.59, respectively, indicating that at least 50% of the mass collected from the aerosol generated was within the respirable diameter (< 4 µm). The mean actual concentration tested was 0.065 mg/L.

Neither compound-related death nor compound-related macroscopic finding on gross necropsy was observed in this study.

No compound-related clinical sign was observed in this study.

The mean body weight increased for both sexes in all post-exposure weighings, except in the first post-exposure weighings for the males. All animals exceeded their initial body weight at the end of the observation period of 14 days.

9. Conclusion

The combined (males and females) median lethal concentration in a 4-hour nose-only exposure period (4-h LC_{50}) to **ALKAZYME** inhaled by Wistar Hannover rats was greater than 0.065 mg/L. When tested at the maximum attainable concentration in the chamber atmosphere, the test item **ALKAZYME** induced no acute inhalation toxicity in the Wistar Hannover rats in a 4-hour nose-only exposure period.

10. References

[1] BRACE, N., KEMP, R., SNELGAR, R. (2003). *SPSS for Psychologists: A guide to data analysis using SPSS for windows.* Palgrave Macmillan, 2nd Ed, NY. 63-70p.

[2] CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals.* Vol. 1, 2nd Edn., 1993.

[3] CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. Guide *to the Care and Use of Experimental Animals.* Vol. 2, 1984.

[4] INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. *Princípios das Boas Práticas de Laboratório - BPL.* Norma Nº NIT-DICLA – 035 – Revisão 02 – Set/2011: Rio de Janeiro, 2011.

[5] NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals:* Eighth Edition. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

[6] OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. (2009). OECD *Guideline for the Testing of Chemicals*, Section 4: Health Effects, 403, Paris.

[7] OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. (1998). OECD *Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. Number 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (as revised in 1997).* Paris. 11-30 p.

[8] OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. (2009). OECD *Series on Testing and Assessment . No. 39. Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing.*

[9] PAULUHN, J. (1984). Head-Only and Nose-Only exposure. In: Grosdanoff et al (Ed.). *Problems inhalation Toxicity Studies*. BGA_Schiriften (5):59-68.

11. Inhalation System Layout

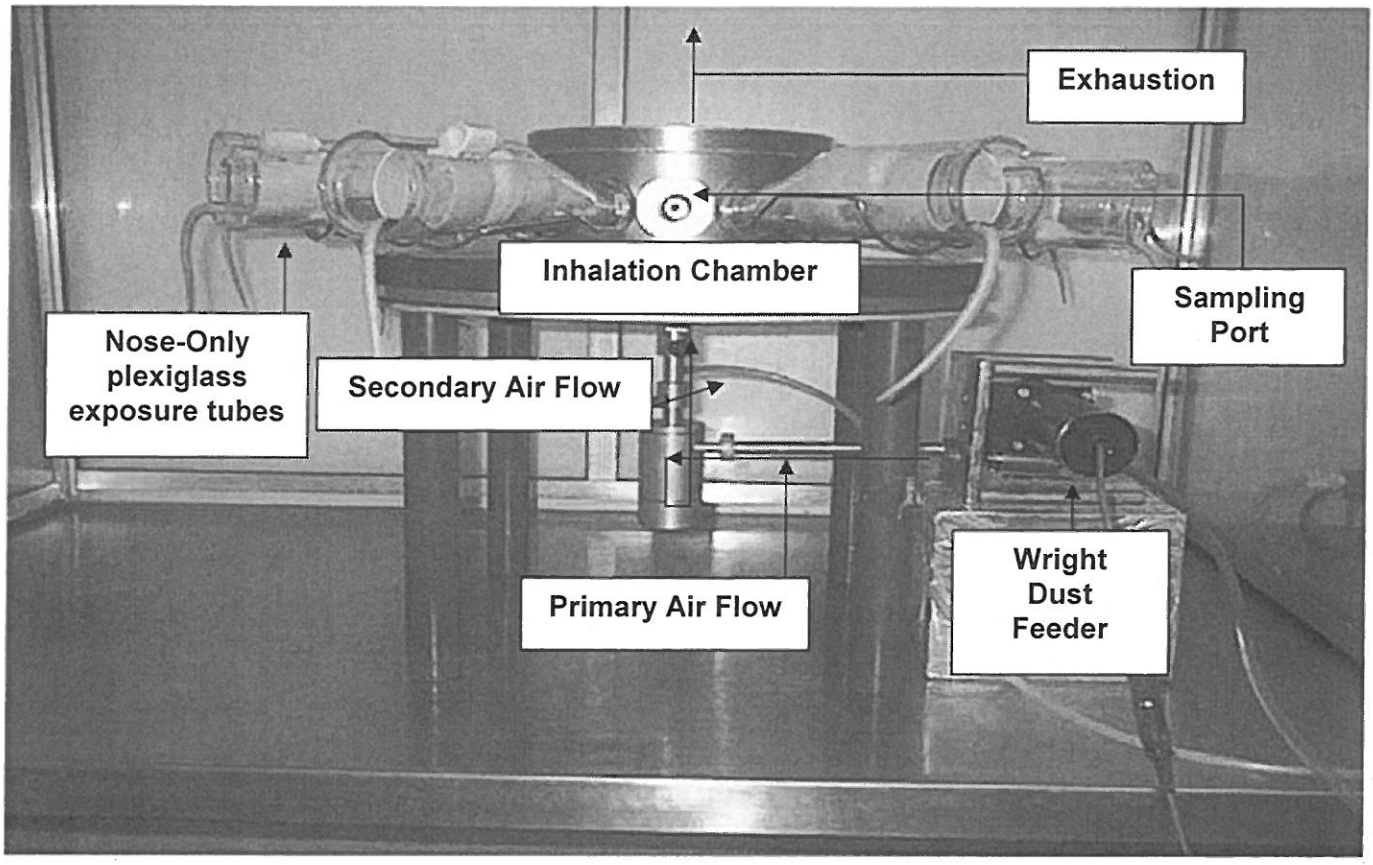


Figure 1. Inhalation system during aerosolization of solid test item.

13. Appendix

13.1. Aerodynamic Particle-Size Distribution

Table 5. Aerodynamic particle-size distribution.

	Impactor Stage #	D_{50}[1] (µm)	Mass of Stage (mg)	Relative Mass (%)	Cumulative Mass % >	Cumulative Mass % <	MMAD[2]	GSD[3]
Sample 1	1	8.23	0.10	21.28	21.28	78.72	3.39	2.88
	2	5.21	0.04	8.51	29.79	70.21		
	3	3.42	0.08	17.02	46.81	53.19		
	4	2.11	0.13	27.66	74.47	25.53		
	5	1.55	0.03	6.38	80.85	19.15		
	6	1.05	0.02	4.26	85.11	14.89		
	7	0.48	0.05	10.64	95.74	4.26		
	Backup filter	-	0.02	4.26	100.00	-		
Sample 2	1	8.23	0.08	21.62	21.62	78.38	3.52	2.59
	2	5.21	0.03	8.11	29.73	70.27		
	3	3.42	0.06	16.22	45.95	54.05		
	4	2.11	0.10	27.03	72.97	27.03		
	5	1.55	0.04	10.81	83.78	16.22		
	6	1.05	0.03	8.11	91.89	8.11		
	7	0.48	0.02	5.41	97.30	2.70		
	Backup filter	-	0.01	2.70	100.00	-		

1. Cut-off diameter;
2. Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD): Is the median aerodynamic diameter, starting from which 50% of the collected mass have the diameter greater than the value calculated, while the other 50% of the collected mass have the diameter lower than the value calculated [6] [8];
3. Geometric Standard Deviation (GSD): Is the calculated deviation from the MMAD [6] [8].

13.2. Individual Clinical Signs

Table 6. Clinical signs and death time observed after airborne exposure to **ALKAZYME** (males).

#	Clinical Signs	Onset		Reversal		Death	
		Day	*Time*	*Day*	*Time*	*Day*	*Time*
1	***N.s.f.***	-	-	-	-	-	-
4	***N.s.f.***	-	-	-	-	-	-
2	***N.s.f.***	-	-	-	-	-	-

N.s.f.: no specific finding; **#**: number of the animals.

Table 7. Clinical signs and death time observed after airborne exposure to **ALKAZYME** (females).

#	Clinical Signs	Onset		Reversal		Death	
		Day	*Time*	*Day*	*Time*	*Day*	*Time*
6	***N.s.f.***	-	-	-	-	-	-
7	***N.s.f.***	-	-	-	-	-	-
8	***N.s.f.***	-	-	-	-	-	-

N.s.f.: no specific finding; **#**: number of the animals.

The exposure day was Febuary 18th 2014 and the exposure period ended at 2:00 p.m.

13.3. Individual Macroscopic Findings

Table 8. Macroscopic findings after airborne exposure to **ALKAZYME** (males).

#	Macroscopic Finding	Affected Organ
1	***N.s.f.***	-
4	***N.s.f.***	-
2	***N.s.f.***	-

#: Number of the animals; **N.s.f.**: No specific finding

Table 9. Macroscopic findings after airborne exposure to **ALKAZYME** (females).

#	Macroscopic Finding	Affected Organ
6	***N.s.f.***	-
7	***N.s.f.***	-
8	***N.s.f.***	-

#: Number of the animals; **N.s.f.**: No specific finding

13.4. Individual Body Weights and Age

Table 10. Individual body weights (g) and age (weeks) of the exposed rats to **ALKAZYME** (males).

MAC	*Age*	*#*	*Day 0*	*Day 1*	*Day 3*	*Day 7*	*Day 14*	*Death*
		1	262	252	266	281	306	-
0.065 mg/L	09	4	256	254	268	282	302	-
		2	259	251	264	277	307	-
Mean			**259.00**					
SD			**3.00**					
-20%			**207.20**					
+20%			**310.80**					

Mean, SD and ±20% values calculated using the Microsoft Excel 2010 ® software and rounded to the second decimal place; **MAC**: mean actual concentration; **#:** animals' number; **SD:** standard deviation.

Table 11. Individual body weights (g) and age (weeks) of the exposed rats to **ALKAZYME** (females).

MAC	*Age*	*#*	*Day 0*	*Day 1*	*Day 3*	*Day 7*	*Day 14*	*Death*
		6	172	170	175	178	183	-
0.065 mg/L	10	7	176	188	193	195	205	-
		8	171	181	190	193	197	-
Mean			**173.00**					
SD			**2.65**					
-20%			**138.40**					
+20%			**207.60**					

Mean, SD and ±20% values calculated using the Microsoft Excel 2010 ® software and rounded to the second decimal place; **MAC**: mean actual concentration; **#:** animals' number; **SD:** standard deviation.

EVIC-CEBA
LABORATOIRE DE RECHERCHE ET D'EXPERIMENTATION

RAPPORT D'ETUDE : T 305/5090 du 5 Juillet 1994

ALKAPHARM

Evaluation de l'effet irritant/corrosif
aigu sur la peau de la préparation

Alkazyme désinfectant – lot 303051.3
(solution à 0,5 %)

BG/CP

Ce rapport contient 7 pages

Z.I. - 33295 BLANQUEFORT - FRANCE
TÉLEX 550 717 - FAX 56 95 05 22
TÉL. 56 35 02 25

1, rue Massue - 94300 VINCENNES - FRANCE
FAX (1) 48 08 62 31
TÉL. (1) 43 65 03 03

S.A. AU CAPITAL DE 2 400 000 FRS - RC 70B70 BORDEAUX - SIRET 470 200 700 00016 - FR 79470200700

Laboratoire accrédité par le
Réseau National d'Essais sous le
n° 29.85/01

Evaluation de l'effet irritant/corrosif
aigu sur la peau de la préparation

Alkazyme désinfectant – lot 303051.3 solution à 0,5 % dans l'eau distillée
(concentration d'utilisation)

Référence de l'étude	: T 305/5090
Protocole utilisé	: ligne directrice 404 de l'OCDE
Produit étudié	: Alkazyme désinfectant – lot 303051.3 dilué à 0,5 % dans l'eau distillée
Commanditaire	: ALKAPHARM
Moniteur de l'étude	: N. SALKIND
Lieu de réalisation de l'étude	: EVIC CEBA – 33295 BLANQUEFORT
Technicien responsable	: Florence PROD'HOMME Po 19.07.94
Directeur de l'étude	: Philippe DUFOUR 18/07/94
Assurance Qualité	: Patrick GOMOND Pour le 19.07.94
Directeur du Laboratoire d'Essai	: Philippe MASSON
Dates d'essai	
Début d'étude	: 7 Juin 1994
Fin d'étude	: 10 Juin 1994

RESULTATS ET CONCLUSION

L'application de 0,5 ml de la préparation **Alkazyme désinfectant – lot 303051.3** diluée à 0,5 % dans l'eau distillée sur la peau tondue de 3 lapins sous pansement semi-occlusif pendant 4 heures provoque chez deux animaux une légère réaction d'irritation cutanée (érythème très léger) réversible en moins de 72 heures.

Selon la directive Européenne 67/548 CEE, la préparation étudiée n'est **pas irritante** pour la peau.

Le rapport d'étude ne concerne que l'objet soumis à l'essai.

1. INTRODUCTION

. But de l'étude

Déterminer sur la peau du lapin l'effet irritant/corrosif d'une substance afin d'extrapoler ses propriétés irritantes à l'être humain.

. Protocole utilisé

L'essai est réalisé selon la ligne directrice 404 de l'OCDE.

2. PRODUIT ETUDIE

- Dénomination, référence : Alkazyme désinfectant – lot 303051.3
- Aspect : poudre blanche
- Quantité reçue, conditionnement : 30 g, flacon en plastique
- Date de réception : 3 Juin 1994
- Numéro d'enregistrement au Laboratoire : 5090
- Fiche d'informations : non communiquée
- Contrôle de l'homogénéité : non exigé pour les études inférieures à 28 jours
- Stockage : à température ambiante, à l'abri de la lumière et de la chaleur
- Archivage : échantillon du produit conservé pendant 10 ans. Le rapport final et les données brutes de l'essai sont archivés dans la salle réservée à cet effet, dans le Laboratoire d'essai.
- Valeur du pH = 11 (produit dilué à 0,5 %)

3. MODE OPERATOIRE

. Système réactif

- Espèce, souche, origine : lapin albinos, Néo-zélandais, élevage COB.LABO.LAP. (22120 – YFFINIAC, FRANCE).
- Raison du choix de l'espèce : le lapin albinos est l'espèce recommandée pour ce type d'étude, car dans la plupart des cas, il est plus sensible que l'Homme aux agents irritants ou corrosifs cutanés.

- Nombre, sexe : 3 mâles
  Si des effets prononcés sur la peau sont prévisibles, l'essai est réalisé sur un animal. En fonction des résultats, l'étude peut ne pas être continuée avec les 2 autres animaux.

- Poids moyen : 2,8 kg

- Identification : bague auriculaire

- Acclimatation : au moins 5 jours

- Stabulation, nourriture : conditions de stabulation conformes aux exigences de la directive 86/609/CEE (en cage individuelle sur grille). Aliment granulé Energie U326, COFNA (37000 – TOURS, FRANCE).

. Conditions d'utilisation du produit

Environ 24 heures avant l'épreuve, la fourrure de la région dorsale du tronc des animaux est tondue avec précaution en évitant d'érafler la peau. Seuls, les animaux présentant une peau saine et intacte sont retenus pour l'essai ;

Le produit testé est appliqué dilué à 0,5 % dans l'eau distillée (concentration d'utilisation) sous pansement semi-occlusif sur la peau des 3 lapins à la dose de 0,5 ml/lapin selon le protocole suivant :

. 0,5 ml de solution est déposé sur la compresse de gaze maintenue en contact avec la peau au moyen d'un ruban adhésif "Micropore" de 5 x 5 cm. Puis, le tronc de l'animal est entouré avec une bande extensible de 10 cm de large (type bande à varice) fixée par une bande adhésive. La bande est placée de manière à ne pas gêner les mouvements respiratoires.

. Les lapins sont remis dans leur cage pendant 4 heures au terme desquelles le pansement et le carré de gaze sont enlevés. La substance résiduelle est éliminée à l'aide d'un papier absorbant imbibé d'eau distillée ou du véhicule approprié.

. Examens cliniques et notations

L'observation des symptômes d'érythème et d'oedème cutanés est effectuée à l'oeil nu 1, 24, 48 et 72 heures après l'enlèvement de la compresse. Elle peut être prolongée 14 jours au maximum si la réversibilité n'est pas totalement établie au bout de 72 heures. Les réactions d'irritation (érythème, oedème) sont notées et enregistrées d'après l'échelle ci-dessous :

Formation d'érythème et d'escarre

- Pas d'érythème	0
- Erythème très léger (à peine perceptible)	1
- Erythème bien défini	2
- Erythème modéré à grave	3
- Erythème grave (couleur rouge violacée) à escarre léger (lésions en profondeur)	4

Formation d'un oedème

- Pas d'oedème	0
- Oedème très léger (à peine perceptible)	1
- Oedème léger (pourtour de la zone oedémateuse bien défini par un gonflement net)	2
- Oedème modéré (gonflement d'1 mm)	3
- Oedème grave (gonflement de plus d'1 mm s'étendant au-delà de la région exposée)	4

Outre les observations concernant l'irritation, toute lésion grave et tout autre effet toxique font l'objet d'une description complète.

. Interprétation des résultats

Compte tenu des résultats et selon la directive 67/548/CEE, la substance ou préparation testée est considérée comme irritante ou corrosive pour la peau dans les cas suivants :

Une substance ou préparation est considérée comme **irritante pour la peau** lorsque son application sous pansement semi-occlusif pendant 4 heures provoque une inflammation importante de la peau caractérisée par la formation d'érythème et d'escarre ou la formation d'oedème équivalant à une valeur moyenne égale ou supérieure à 2, calculée pour chaque animal chez deux animaux au moins.

Ces réactions doivent persister 24 heures au moins après la fin de la période d'exposition.
Toutes les lectures faites 24 h, 48 h et 72 h après l'enlèvement des pansements sont prises en compte pour calculer les valeurs moyennes respectives.
L'inflammation de la peau est également importante, si elle persiste sur au moins deux animaux à la fin de la période d'observation (directive 93/21/CEE).

Une substance ou préparation est considérée comme **corrosive pour la peau** lorsque son application sur la peau saine et intacte produit des destructions tissulaires sur toute la profondeur de la peau chez un animal au moins.

Il y a risque de graves brûlures lorsque les lésions tissulaires apparaissent après un temps d'exposition ne dépassant pas 3 minutes.
Il y a risque de brûlure lorsque ces lésions apparaissent après un temps d'exposition ne dépassant pas quatre heures.

4. RESULTATS ET CONCLUSION

Les réactions d'irritation constatées chez chaque animal au moment de chaque observation sont rapportées dans le tableau ci-après.

Dans les conditions expérimentales adoptées, l'application de la préparation **Alkazyme désinfectant – lot 303051.3** diluée à 0,5 % dans l'eau distillée, sur la peau du lapin pendant 4 heures provoque chez deux animaux l'apparition d'un érythème très léger totalement réversible en 72 heures.

L'interprétation des résultats faite selon la Directive Européenne 67/548/CEE permet de classer la préparation **Alkazyme désinfectant – lot 303051.3** à 0,5 % dans l'eau distillée parmi les préparations **non irritantes** pour la peau.

OCDE 404

EVALUATION DE L'EFFET IRRITANT et/ou CORROSIF AIGU SUR LA PEAU DU LAPIN

ALKAZYME DESINFECTANT – lot 303051.3

N° étude : T 305 / 5090 Patchage 4 heures

Mode d'application : 0.5 ml de produit dilué à 0,5% par pansement semi-occlusif
Début d'essai : 07.06.94

ERYTHEME
Peau Normale

N° ax	1 heure	24 heures	48 heures	72 heures	Moyenne
3356	1	1	0	0	**0,3**
3357	0	0	0	0	**0,0**
3358	1	1	1	0	**0,7**

OEDEME
Peau Normale

N° ax	1 heure	24 heures	48 heures	72 heures	Moyenne
3356	0	0	0	0	**0,0**
3357	0	0	0	0	**0,0**
3358	0	0	0	0	**0,0**

EVIC-CEBA
LABORATOIRE DE RECHERCHE ET D'EXPERIMENTATION

RAPPORT D'ETUDE : T 306/5090 du 18 Juillet 1994

ALKAPHARM

Evaluation de l'effet irritant/corrosif
aigu sur les yeux de la préparation

Alkazyme désinfectant – lot 303051.3
(solution à 0,5 %)

BG/CP

Ce rapport contient 9 pages

Z.I. - 33295 BLANQUEFORT - FRANCE
TÉLEX 550 717 - FAX 56 95 05 22
TÉL. 56 35 02 25

1, rue Massue - 94300 VINCENNES - FRANCE
FAX (1) 48 08 62 31
TÉL. (1) 43 65 03 03

S.A. AU CAPITAL DE 2 400 000 FRS - RC 70B70 BORDEAUX - SIRET 470 200 700 00016 - FR 79470200700

Laboratoire accrédité par le
Réseau National d'Essais sous le
n° 29.85/01

Evaluation de l'effet irritant/corrosif aigu sur les yeux de la préparation

Alkazyme désinfectant – lot 303051.3 solution à 0,5 % dans l'eau distillée
(concentration d'utilisation)

Référence de l'étude	: T 306/5090
Protocole utilisé	: ligne directrice 405 de l'OCDE
Produit étudié	: Alkazyme désinfectant – lot 303051.3 dilué à 0,5 % dans l'eau distillée
Commanditaire	: ALKAPHARM
Moniteur de l'étude	: N. SALKIND
Lieu de réalisation de l'étude	: EVIC CEBA – 33295 BLANQUEFORT
Technicien responsable	: Florence PROD'HOMME Bagan Po 19/07/
Directeur de l'étude	: Philippe DUFOUR 19/07/94
Assurance Qualité	: Patrick GOMOND Po le 19/07/94
Directeur du Laboratoire d'Essai	: Philippe MASSON
Dates d'essai	
Début d'étude	: 6 Juin 1994
Fin d'étude	: 9 Juin 1994

RESULTATS ET CONCLUSION

L'instillation de la préparation **Alkazyme désinfectant – lot 303051.3** diluée à 0,5 % dans l'eau distillée à la dose de 0,1 ml dans l'oeil de 3 lapins provoque dans l'heure qui suit une légère irritation des conjonctives oculaires et palpébrales (rougeur diffuse, légère tuméfaction et quelques larmoiements). Ces réactions régressent totalement en moins de 72 heures. Des lésions de l'iris (congestion) sont notées dans l'heure suivant l'instillation du produit ; elles régressent totalement le lendemain.

Selon la directive Européenne 67/548/CEE la préparation testée n'est pas **irritante** pour l'oeil.

Le rapport d'étude ne concerne que l'objet soumis à l'essai.

1. INTRODUCTION

. But de l'étude

Déterminer sur l'oeil du lapin l'effet irritant/corrosif d'une substance afin d'extrapoler ses propriétés irritantes à l'être humain.

. Protocole utilisé

L'essai est réalisé selon la ligne directrice 405 de l'OCDE.

2. PRODUIT ETUDIE

- Dénomination, référence : Alkazyme désinfectant – lot 303051.3
- Aspect : poudre blanche
- Quantité reçue, conditionnement : 30 g, flacon en plastique
- Date de réception : 3 Juin 1994
- Numéro d'enregistrement au Laboratoire : 5090
- Fiche d'informations : non communiquée
- Contrôle de l'homogénéité : non exigé pour les études inférieures à 28 jours
- Stockage : à température ambiante, à l'abri de la lumière et de la chaleur
- Archivage : échantillon du produit conservé pendant 10 ans. Le rapport final et les données brutes de l'essai sont archivés dans la salle réservée à cet effet, dans le Laboratoire d'Essai.
- Valeurs de pH = 11 (produit dilué à 0,5 %)

3. MODE OPERATOIRE

. Système réactif

- Espèce, souche, origine : lapin albinos, Néo-zélandais, élevage COB.LABO.LAP. (22120 – YFFINIAC, FRANCE).
- Raison du choix de l'espèce : le lapin albinos est l'espèce recommandée pour ce type d'étude, car dans la plupart des cas, il est plus sensible que l'Homme aux agents irritants ou corrosifs oculaires.

- Nombre, sexe : 3 mâles
  Si des effets prononcés sur l'oeil sont prévisibles, l'essai est réalisé sur un animal. En fonction des résultats, l'étude peut ne pas être continuée avec les 2 autres animaux.

- Poids moyen : 2,5 kg

- Identification : bague auriculaire

- Acclimatation : au moins 5 jours

- Stabulation, nourriture : conditions de stabulation conformes aux exigences de la directive 86/609/CEE (en cage individuelle sur grille). Aliment granulé Energie U326, COFNA (37000 – TOURS, FRANCE).

. Conditions d'utilisation du produit

Après avoir vérifié que les deux yeux de chaque animal d'expérience sont sains et sans défaut, la substance est instillée dans le cul-de-sac conjonctival de l'oeil droit à la dose de 0,1 ml ou 0,1 g si le produit est pateux ou solide.
Les paupières sont maintenues fermées pendant environ 1 seconde pour éviter la perte de substance et favoriser le contact.

L'oeil gauche, qui ne subit pas le traitement sert de témoin.

Après 1 heure de contention, les animaux sont remis dans leur cage.

Dans cet essai, le produit est utilisé dilué à 0,5 % dans l'eau distillée (concentration d'utilisation) à la dose de 0,1 ml par oeil.

. Examens cliniques et notations

Pour procéder à l'évaluation de l'irritation oculaire, les animaux sont immobilisés sur une table et les yeux examinés comparativement 1 h, 24 h, 48 h et 72 h après l'instillation du produit.

L'essai est arrêté si aucune irritation ne se manifeste après 72 heures. Il peut être prolongé au maximum pendant 21 jours si l'irritation oculaire est persistante ou en cas d'atteinte cornéenne. Si les lésions sont trop graves, pour éviter toute douleur inutile, l'animal est sacrifié.

Les réactions sont examinées au moyen d'une lampe loupe à lumière blanche et de Wood intégrées.

Après enregistrement des observations effectuées à la 24ème heure, l'examen des yeux est poursuivi au moyen de fluoresceine.

La cotation des irritations oculaires aux différents intervalles d'observation pour chaque lapin est effectuée selon l'échelle numérique (critères de Draize) ci-après en suivant l'ordre décrit :

Conjonctive

Chémosis (A) : paupières et/ou membrane nictitante

- Pas de tuméfaction 0
- Toute tuméfaction supérieure à la normale (y compris de la membrane nictitante) 1
- Tuméfaction évidente avec éversion partielle des paupières 2
- Tuméfaction avec paupières à peu près à moitié fermées 3
- Tuméfaction avec paupières plus qu'à moitié fermées 4

Larmoiement (B) :

- Absence de larmoiement 0
- Larmoiement léger (ne pas tenir compte des légères sécrétions existant normalement dans l'angle interne) 1
- Larmoiement avec humidification des paupières et des poils avoisinant les paupières 2
- Larmoiement avec humidification des paupières et des poils sur de larges surfaces autour de l'oeil 3

Rougeur (C) : s'applique aux conjonctives palpébrale et bulbaire, à la cornée et à l'iris

- Vaisseaux sanguins normaux 0
- Nette hyperhémie de certains vaisseaux sanguins (yeux injectés) 1
- Coloration pourpre diffuse, vaisseaux sanguins individuels difficilement discernables 2
- Coloration rouge soutenu diffuse 3

Iris (D)

- Normal 0

- Plis nettement plus profonds, congestion, tuméfaction, hyperhémie péricornéenne modérée ou conjonctives injectées, n'importe lequel de ces symptômes ou toute combinaison de plusieurs d'entre eux, l'iris continuant à réagir à la lumière (une réaction lente est positive) 1

- Absence de réaction à la lumière, hémorragie, destruction marquée (chacun de ces symptômes ou l'ensemble) 2

Cornée

Opacité (E) : degré de densité (les observations portent sur les zones les plus denses)

- Pas d'ulcération ni d'opacité 0

- Zones d'opacité (autre qu'un léger ternissement de l'éclat normal) dispersées ou diffuses, détails de l'iris nettement visibles 1

- Zone translucide aisément discernable, détails de l'iris légèrement masqués 2

- Zones nacrées, détails de l'iris complètement invisibles, dimension de la pupille à peine discernable 3

- Cornée opaque, iris non discernable à travers l'opacité 4

Surface d'opacité (F) :

- Un quart (ou moins mais non nulle) 1

- Entre le quart et la moitié 2

- Entre la moitié et les trois quarts 3

- Des trois quarts à toute la surface 4

. Interprétation des résultats

Selon la directive 67/548/CEE, la substance ou préparation testée est considérée comme **irritante pour les yeux** si elle provoque des lésions oculaires importantes qui surviennent au cours des 72 heures suivant l'instillation et persistent 24 heures au moins.

Une lésion oculaire est considérée comme importante si les valeurs moyennes des mesures pour chaque type de lésion calculées pour chaque animal d'après les observations effectuées aux lectures 24, 48 et 72 heures sont équivalentes, chez deux animaux au moins aux valeurs suivantes :

. 2 ≤ opacité cornéenne	< 3
. 1 ≤ lésion de l'iris	< 2
. rougeur de la conjonctive	≥ 2,5
. oedème de la conjonctive (chémosis)	≥ 2

Il y a risque de lésions oculaires graves lorsque ces lésions (chez 2 animaux au moins) sont équivalentes à :

. opacité cornéenne	≥ 3
. lésion de l'iris	= 2

Les lésions oculaires sont également graves lorsqu'elles persistent à la fin de la période d'observation (directive 93/21/CEE).

4. RESULTATS ET CONCLUSION

Les lésions oculaires constatées chez chaque animal au moment de chaque observation sont rapportées dans le tableau ci-après.

Une heure après l'instillation du produit testé, des réactions peu marquées sont notées au niveau des conjonctives : coloration pourpre diffuse, légère tuméfaction. Elles sont accompagnées d'un larmoiement léger.
Les observations effectuées à la 24ème heure montrent une régression de la rougeur conjonctivale, le chémosis et le larmoiement ne sont plus visibles.
La rougeur conjonctivale perdure 48 heures avant de disparaître chez tous les animaux en 3 jours.
Une congestion de l'iris est notée chez deux lapins 1 heure après le traitement et régresse totalement en 24 heures.

L'interprétation des résultats faite selon la Directive Européenne 67/548/CEE permet de classer la préparation **Alkazyme désinfectant - lot 303051.3** à 0,5 % dans l'eau distillée parmi les préparations **non irritantes** pour l'oeil.

OCDE 405

EVALUATION DE L'EFFET IRRITANT et/ou CORROSIF AIGU SUR LES YEUX DU LAPIN

ALKAZYME DESINFECTANT – lot 303051.3

N° étude : T 306 / 5090

Mode d'application : 0.1 ml de produit dilué à 0,5% dans l'oeil droit
Début d'essai : 06.06.94

CONJONCTIVE

Chemosis (A)

N° ax	J1 (1h)	24 heures	48 heures	72 heures	Moyenne
3321	2	0	0	0	**0,0**
3322	1	0	0	0	**0,0**
3344	1	0	0	0	**0,0**

Larmoiements (B)

3321	1	0	0	0	**0,0**
3322	2	0	0	0	**0,0**
3344	1	1	1	0	**0,7**

Rougeurs (C)

3321	2	1	1	0	**0,7**
3322	2	1	1	0	**0,7**
3344	2	1	1	0	**0,7**

IRIS (D)

3321	1	0	0	0	**0,0**
3322	1	0	0	0	**0,0**
3344	0	0	0	0	**0,0**

CORNEE

Opacité (E)

3321	0	0	0	0	**0,0**
3322	0	0	0	0	**0,0**
3344	0	0	0	0	**0,0**

Surface d'opacité (F)

3321	0	0	0	0	**0,0**
3322	0	0	0	0	**0,0**
3344	0	0	0	0	**0,0**

EVIC-CEBA
LABORATOIRE DE RECHERCHE ET D'EXPERIMENTATION

ETUDE : Te 772 / 98-4556

ALKAPHARM

EVALUATION DU POTENTIEL DE SENSIBILISATION CUTANEE CHEZ LE COBAYE

- Essai par maximisation - EMC -

NF.EN.ISO 10993-10- Mars 1996

ALKAZYME

- RAPPORT D'ETUDE -

Ce rapport comporte 14 pages dont 4 en Annexes

Blanquefort, le 9 février 1999

Z.I. 48, rue Jean Duvert - 33295 BLANQUEFORT - FRANCE
TÉL. (33) 05 56 95 59 95
FAX (33) 05 56 95 05 22
E mail : evic ceba@aol.com
S.A. au capital de 2 400 000 Frs - RC 70870 Bordeaux - SIRET 470 200 700 00016 - FR 79470200700

1, rue Massue - 94300 VINCENNES - FRANCE
TÉL. (33) 01 41 74 40 00
FAX (33) 01 41 74 40 19

SOMMAIRE

RESUME 2

1. OBJECTIF ET PRINCIPE DE L'ESSAI 3

2. AUTORISATIONS ET RESPONSABILITES 3

3. ASSURANCE QUALITE 3

4. DEFINITION DE LA SUBSTANCE ETUDIEE 4

4.1. Référence de la substance 4

4.2. Stockage 4

5. SYSTEME REACTIF 4

6. MODE OPERATOIRE 5

6.1. Préparation de la substance à tester 5

6.2. Niveaux de dose - essais préliminaires 5

6.3. Essai proprement dit : détermination du potentiel de sensibilisation cutanée 6

6.4. Interprétation des résultats 9

6.5. Vérification de la sensibilité et de la fiabilité de la méthode 9

7. RESULTATS 10

7.1. Essais préliminaires 10

7.2. Essai proprement dit 10

8. CONCLUSION 10

ANNEXES 11-14

EVALUATION DU POTENTIEL DE SENSIBILISATION CUTANEE CHEZ LE COBAYE - ESSAI PAR MAXIMISATION - EMC - LIGNES DIRECTRICES 406 DE L'OCDE (17/7/1992)

SKIN SENSITISATION BY THE GUINEA PIG MAXIMISATION TEST METHOD - GPMT - OECD GUIDELINE 406 (17/7/1992)

RESUME/*SUMMARY*

- **Substance étudiée/*Test substance* : ALKAZYME**

- **Principe de l'essai/*Principle of the study* :**

L'objectif de l'essai a été d'évaluer, chez 30 cobayes, le potentiel sensibilisant de la substance à l'essai appliquée par voie cutanée. L'effet recherché a été maximisé par injection d'Adjuvant Complet de Freund. Les animaux ont été exposés à la substance à l'essai par injection intradermique et application topique dans des conditions irritantes (exposition d'induction). Après une période de repos de 10 à 14 jours (période d'induction), les animaux ont été exposés à une dose de déclenchement.

L'étendue et le degré de la réaction cutanée des animaux ont été comparés à ceux de la réaction observée chez les animaux témoins ne recevant que le véhicule lors de l'induction et soumis à l'exposition de déclenchement.

La substance à tester a été classée en fonction du pourcentage d'animaux réactifs.

The aim of the study was to assess, in 30 guinea-pigs, the skin sensitisation potential of the test substance. The effect was potentiated by the injection of Freund's Complete Adjuvant. The animals were initially exposed to the test substance by intradermal injection and epidermal application (induction exposure). Following a rest period of 10 to 14 days (induction period), the animals were exposed to a challenge dose.

The extent and degree of skin reaction to the challenge exposure in the test animals were compared with those demonstrated by control animals which underwent sham treatment during induction and received the challenge exposure.

The test substance was classified in accordance with the percentage of reactive animals.

- **Dates de l'essai/*Dates of the study* :** du/*from* 14/12/98 au/*to* 05/02/99

- **Résultats/*Results* :**

Pourcentage d'animaux réactifs/percentage of reactive animals : 0%

- **Conclusion/*Conclusion* :**

La substance testée est classée parmi les substances **non sensibilisantes** par contact avec la peau (classe 1).
The test substance *is classified among the products* ***non sensitizing*** *by contact with the skin (class 1).*

1. OBJECTIF ET PRINCIPE DE L'ESSAI

L'objectif de l'essai a été d'évaluer, chez le Cobaye, le potentiel sensibilisant de la substance **ALKAZYME** par voie cutanée. L'effet recherché a été maximisé par injection d'Adjuvant Complet de Freund (ACF).

Le cobaye a été choisi, parce que représentant historiquement l'animal qui convient le mieux pour ce type d'essai.

Les animaux ont été dans un premier temps exposés au substance à l'essai par injection intradermique et application topique dans des conditions irritantes (exposition d'induction). Après une période de repos de 10 à 14 jours (période d'induction) au cours de laquelle une réaction immunitaire a pu se produire, les animaux ont été exposés à une dose de déclenchement.

L'étendue et le degré de la réaction cutanée des animaux ont été alors comparés à ceux de la réaction observée chez les animaux témoins qui ont reçu le véhicule lors de l'induction et qui ont été soumis à l'exposition de déclenchement.

La méthodologie utilisée a suivi la ligne directrice n° 406 de l'OCDE du 17 juillet 1992 concernant les essais de substances chimiques et la section B6 de l'annexe IV.C de la Directive Européenne 96/54/CEE du 30 juillet 1996, parue au Journal Officiel des Communautés Européennes du 30 septembre 1996 (L248) et la partie 10 « Essais d'irritation » de la norme ISO NF.EN.ISO 10993 (mars 1996) qui reproduit intégralement la norme internationale ISO 10993-10-1995.

Elle s'est inspirée de la technique décrite par B. Magnusson et A. Kligman dans J. Invest. Dermatol, 1969, 52, 3, 268-276.

2. AUTORISATIONS ET RESPONSABILITES

Cette étude a été couverte par l'accréditation de la **section Essais du COFRAC** qui a attesté de la compétence technique du Laboratoire.

L'étude a été intégralement réalisée dans les locaux des Laboratoires Evic-Ceba à Blanquefort, selon les règles d'éthique animale indiquées dans la **Directive Européenne 86/609/CEE du 24 novembre 1986** et a été soumise à l'avis préalable du Comité d'Ethique animale interne au Laboratoire d'Essais.

L'étude a été effectuée sous l'autorité du Directeur d'Etudes, conformément aux principes des **Bonnes Pratiques de Laboratoire** dans le cadre de la toxicologie expérimentale (Instruction du 31 mai 1983, texte officiel n° 1065 référencé SN - S/83/25, publié par le Ministère français des Affaires Sociales et de la Solidarité Nationale et Directive 87/18/CEE du 18 décembre 1986 et son décret d'application N° 90-206 du 07 mars 1990 paru au J.O.R.F. du 09 mars 1990), le laboratoire disposant par ailleurs, de la reconnaissance de conformité aux principes des Bonnes Pratiques de Laboratoire par le **GIPC** et **l'Agence du médicament**.

3. ASSURANCE QUALITE

Toutes les données recueillies au cours de l'essai ont été consignées par le technicien en charge de l'étude, sur les documents réservés à cet effet.

Chaque page de ces documents a été paraphée et datée par le technicien responsable de l'étude.
Toute donnée manquante a été justifiée et toute correction a été paraphée et datée.

Le Service Assurance Qualité a vérifié par des inspections régulières, le respect du protocole et des procédures de travail relatives à ce type d'essai.

Les données expérimentales et le rapport d'étude ont été audités conformément à la procédure mise en place au Laboratoire d'Essais.

La dernière inspection a eu lieu le 4 février 1999.

En fin d'étude, les documents de travail ont été archivés avec le rapport d'étude et seront conservés pendant 10 ans.

4. DEFINITION DE LA SUBSTANCE ETUDIEE

4.1. Référence de la substance

Le Commanditaire a fait parvenir au Laboratoire 1 seau contenant 2 kg de la substance **ALKAZYME.**

Il s'agissait d'une poudre blanche.

Cette substance a été enregistrée au Laboratoire sous la référence 98-4556.

4.2. Stockage

La substance a été stockée à température ambiante et à l'abri de la lumière dans un local spécialement aménagé à cet effet.

Un échantillon de substance a été classé dans l'échantillothèque du Laboratoire à titre de référence ; il y sera conservé jusqu'à la date de péremption ou, au plus, pendant 10 ans.

5. SYSTEME REACTIF

Espèce : Cobayes albinos Hartley

Origine : Elevage Charles River (76410 Saint Aubin les Elbeuf, France)

Poids à la mise en période d'acclimatation : inférieur ou égal à 500 g (essai proprement dit)

Sexe : femelles nullipares et non gravides

Nombre : 35

- pour les essais préliminaires : 5

- 2 pour la confirmation de la concentration maximale irritante (irritation de niveau érythèmal 2) après injection intradermique,
- 3 pour la confirmation de la concentration maximale irritante (irritation de niveau érythèmal 1) par application topique et pour la confirmation de la concentration maximale non irritante par application topique.

- pour l'essai proprement dit : 30

- 20 pour le groupe traité
- 10 pour le groupe témoin

Acclimatation : pendant 5 jours au moins avant le début de l'essai

Identification : chaque animal a été identifié par un marquage auriculaire et le numéro correspondant a été reporté sur une étiquette apposée sur sa cage

Hébergement : les animaux ont été hébergés à raison de 1 par cage, dans des cages en polypropylène de 31 cm x 46 cm x 19 cm munies d'un couvercle en inox.
La litière renouvelée régulièrement a été constituée de sciure dépoussiérée. Elle a été livrée par SICSA (94142 ALFORTVILLE, France).

Les cages ont été placées dans un local d'accès limité, de 7 m x 4 m x 3 m maintenu en légère surpression (10 mm d'eau minimum), sous air régulé en température (t = 21 ± 3°C) et humidité relative contrôlée (HR = 50 ± 20 %) excepté pendant les cycles de lavage et dont le renouvellement en air non recyclé filtré (sur filtre 99 %) s'est fait à raison de 10 cycles par heure environ.
L'éclairage artificiel a assuré 12 heures de lumière par jour et 12 heures d'obscurité.
Tout le personnel qui est entré dans l'animalerie a revêtu des vêtements spécifiques.

Nourriture : l'aliment complet a été fourni sous forme de granulé 106, garantissant une teneur appropriée en acide ascorbique, livré par UAR (91360 Epinay sur orge, France).

Boisson : eau d'adduction distribuée en biberons en polypropylène munis d'une tétine en inox.
Un échantillon d'eau est prélevé après toute intervention technique sur la canalisation et au minimum tous les 6 mois et envoyé pour analyse physico-chimique et bactériologique à un organisme de contrôle spécialisé.

6. MODE OPERATOIRE

6.1. Préparation de la substance à tester

La substance a été utilisée, dans les essais préliminaires et l'essai proprement dit, en application topique, diluée dans l'eau pour préparation injectable (eau PPI), véhicule choisi après réalisation d'essais préalables de solubilité.

En injection intradermique, pour les essais préliminaires et l'essai proprement dit, la substance a été utilisée diluée dans l'eau PPI.

La préparation du produit s'est faite extemporanément chaque jour de traitement en quantité suffisante pour les besoins de l'essai. Le mode de préparation a été reporté dans le document de travail réservé à cet effet.

La préparation a été réalisée en salle d'étude selon les modalités définies dans la procédure du Laboratoire.

6.2. Niveaux de dose - essais préliminaires

La concentration de substance à tester utilisée pour chaque exposition inductrice était bien tolérée par l'organisme et a correspondu à la concentration maximale entraînant une irritation cutanée légère à modérée (CMI), lue 24 heures après injection intradermique et 48 heures après application topique.

La concentration utilisée pour l'exposition déclenchante a été la concentration maximale non irritante pour la peau (CMNI).

6.2.1. Confirmation de la CMI par injection intradermique - (CMI_{ID})

Avant l'essai proprement dit, 2 cobayes préalablement traités à l'Adjuvant Complet de Freund ont été tondus au niveau dorso-lombaire sur une surface d'environ 30 cm^2. Ils ont reçu, de part et d'autre de la colonne vertébrale, la substance à l'essai sous forme d'extrait à 4 concentrations différentes en injection intradermique, sous un volume de 0,1 ml.

La concentration la plus forte a été fixée à **0,5 %** dans l'eau PPI par le Commanditaire.
Les trois autres concentrations choisies ont été : 0,25 % - 0,125 % - 0,0625 % dans l'eau PPI.

24 heures ± 1 heure après l'injection, les réactions d'irritation cutanée ont été appréciées selon l'échelle de cotation utilisée dans l'essai proprement dit (paragraphe 6.3.4).

La CMI_{ID} ou concentration maximale entraînant une irritation de type érythémal chez les animaux (d'intensité 2 selon Magnusson et Kligman pour au moins l'un d'entre-eux) après injection intradermique a été déterminée et retenue pour l'exposition inductrice par voie intradermique lors de l'essai proprement dit.

Toutes les données ont été consignées dans le document de travail réservé à cet effet.

6.2.2. Confirmation de la CMI par application topique (CMI_T) et de l'effet non irritant par application topique (CMNI)

Plusieurs jours avant l'essai proprement dit, 3 cobayes ont été tondus au niveau scapulaire sur une surface d'environ 60 cm^2. Ils ont reçu, de part et d'autre de la colonne vertébrale, sur la région débarrassée de ses poils, 3 paires d'injections intradermiques, sous un volume de 0,1 ml, des 3 préparations suivantes :

① Adjuvant Complet de Freund (ACF) dilué à 50 % dans l'eau PPI (v/v)
② Eau PPI (véhicule)
③ mélange 50/50 des solutions ② et ① (v/v).

Après une période de repos de 7 jours, les animaux ont été à nouveau tondus au niveau dorso-lombaire.
Les sites de peau ont été repérés. Conformément aux exigences du Commanditaire, 4 concentrations différentes (0,5 % - 0,25 % - 0,125 % - 0,0625 %) de la substance dans le véhicule choisi (Eau PPI) ont été déposés sur des pansements composés d'un carré de papier filtre de 2 x 2 cm (soit 4 cm^2), posé sur un carré de gaze hydrophile de 4 cm^2, lui-même posé sur un morceau de film occlusif Blenderm® de 45 cm^2. Les pansements occlusifs ont été maintenus en place au moyen d'un film adhésif Micropore® qui a entouré le tronc de l'animal sans provoquer de gêne respiratoire.

La quantité de la substance à l'essai (ou de ses dilutions) déposée sur le pansement a été de : 0,20 ml.

Les pansements ont été maintenus 24 heures ± 1 heure au contact avec la peau. Après ce temps de contact, ils ont été enlevés.
Les réactions d'irritation cutanée ont été appréciées, selon l'échelle de cotation utilisée dans l'essai proprement dit (paragraphe 6.3.4) après l'enlèvement des pansements.

La substance a été retenue comme CMI_T (ou concentration maximale irritante topique) si elle a entraîné au maximum une irritation de type érythémal d'intensité 1 chez au moins 1 des 3 animaux

Le Directeur d'Etudes a éventuellement retenu, si aucun érythème n'a été observé, la nécessité d'induire une irritation préalable avec du lauryl sulfate de sodium pour l'exposition inductrice par voie topique lors de l'essai proprement dit.

La CMNI ou concentration maximale n'induisant aucune réaction cutanée chez les 3 animaux a été déterminée et retenue pour l'exposition déclenchante de l'essai proprement dit ainsi que la CMNI/2 ou une concentration inférieure à la CMNI/2 (concentration de « sécurité » compte tenu du faible effectif d'animaux dans les essais préliminaires).

Toutes les données ont été consignées dans le document de travail réservé à cet effet.

6.3. Essai proprement dit : détermination du potentiel de sensibilisation cutanée

6.3.1. Répartition des animaux par lot

Les animaux ont été tondus, au niveau scapulaire, à **J-1** (en période d'acclimatation) en évitant toute abrasion de la peau.

A **J1,** les 30 animaux ont été répartis entre le lot traité et le lot témoin par tirage au hasard, selon la table de randomisation de Moses et Oakford.

Le groupe traité a été soumis à toutes les phases de l'expérimentation : induction et déclenchante avec la substance à tester.
Le groupe témoin n'a reçu la substance à tester qu'en fin d'essai en application primaire.

Les animaux ont été pesés et mis en cage individuelle.

6.3.2. Expositions inductrices

A J1 : injections intradermiques

- Groupe témoin = lot 1

Trois paires d'injections intradermiques, sous un volume de 0,1 ml, ont été effectuées dans la région scapulaire de part et d'autre de la ligne médiane.

① ACF dilué à 50 % dans l'eau PPI (v/v)
② Eau PPI (véhicule)
③ mélange 50/50 des solutions ② et ① (v/v).

- Groupe traité = lot 2

Trois paires d'injections intradermiques, sous un volume de 0,1 ml, ont été parallèlement effectuées aux mêmes sites et dans le même ordre que pour les animaux témoins.

① ACF dilué à 50 % dans l'eau PPI (v/v)

② la substance à l'essai à la concentration définie précédemment (CMI_{ID}) (la solution a été homogénéisée par aspirations et refoulements successifs avec une seringue sans aiguille).

③ la substance à l'essai à la même concentration qu'en ② dans un mélange 50/50 (v/v) d'ACF et d'eau PPI (v/v) (le mélange a été homogénéisé par aspirations et refoulements successifs avec une seringue sans aiguille).

Pour l'injection 3, la substance hydrosoluble a été dissoute dans la phase aqueuse avant d'être mélangée à l'ACF.

Les injections 1 et 2 ont été situées à proximité l'une de l'autre le plus près possible de la tête, tandis que l'injection 3 a été effectuée vers la partie caudale de la surface d'essai.

A J7 : après 6 jours de repos, les animaux ont été à nouveau tondus.

La substance n'ayant pas provoqué d'irritation cutanée, la zone d'essai tondue a été badigeonnée avec 0,50 ml de lauryl sulfate de sodium à 10 % dans la vaseline, afin de créer une irritation locale. Ce traitement a été réalisé chez les 2 groupes d'animaux (traité et témoin).

A J8 : application topique

- Groupe témoin = lot 1

0,50 ml de véhicule (Eau PPI) a été déposé sur le pansement constitué d'un rectangle de papier filtre de 8 cm^2 (2 cm x 4 cm), posé sur un rectangle de gaze hydrophile de 8 cm^2, lui même posé sur un carré de film occlusif Blenderm® de 25 cm^2. Le pansement occlusif a été appliqué sur la peau et maintenu en place au moyen d'un film adhésif Micropore® qui a entouré le tronc de l'animal, pendant 48 heures ± 1 heure.

- Groupe traité = lot 2

0,50 ml de la substance à l'essai à la CMI_T a été appliqué selon la méthode définie précédemment et laissé en contact avec la peau pendant 48 heures ± 1 heure.

A J10 : les pansements ont été enlevés et les réactions cutanées ont été observées et consignées dans le document de travail réservé à cet effet.

6.3.3. Exposition déclenchante

A J28 : application topique

Après une période de repos de 11 jours, les cobayes des 2 lots ont été tondus de part et d'autre de la colonne vertébrale au niveau dorso-lombaire, sur une zone qui n'a jamais été au contact de la substance.

0,20 ml de substance à sa CMNI et 0,20 ml de substance à sa CMNI/2 ont été appliqués respectivement sur 2 pansements constitués chacun d'un carré de papier filtre de 2 cm² qui a reçu la substance, posé sur un carré de gaze hydrophile de 4 cm², posé lui même sur un film occlusif Blenderm® de 25 cm².

Les pansements ont été maintenus sur l'un des flancs de l'animal par un film Micropore®.

Les pansements occlusifs ont été laissés en contact 24 heures ± 1 heure.

6.3.4. Observations et cotation

A J29 : les pansements ont été enlevés chez les animaux des 2 lots.

A J30 : 24 heures après l'enlèvement des pansements et donc 48 heures après le début de l'application, les réactions cutanées ont été observées et cotées, pour chaque animal, selon l'échelle de cotation de Magnusson et Kligman indiquée ci-dessous :

Erythème et formation d'escarre (E) :

- pas d'érythème 0
- léger érythème 1
- érythème bien défini 2
- érythème modéré 3
- érythème grave à formation de légère escarre 4

Formation d'oedème (O) :

- pas d'oedème 0
- oedème léger 1
- oedème bien défini 2
- oedème modéré 3
- oedème grave 4

Les animaux ont été tondus après les lectures.

A J31 et J32 : 24 et 48 heures plus tard, une seconde et une troisième observations (soit 48 et 72 heures après l'enlèvement des pansements et donc 72 et 96 heures après l'application) ont été réalisées.

Tous les animaux ont été pesés après la troisième lecture.

Toutes les réactions cutanées et toutes les constatations inhabituelles (oedèmes ...), y compris les réactions de l'organisme, liées aux opérations d'induction et de déclenchement ont été observées et enregistrées dans le document de travail réservé à cet effet.

6.4. Interprétation des résultats

Le potentiel sensibilisant de la substance testé a été fonction du pourcentage d'animaux réactifs lors de l'exposition déclenchante. L'étendue et le degré de la réaction cutanée chez les animaux traités ont été comparés à ceux obtenus chez les animaux témoins qui ont subi un traitement identique, exception faite de la substance pendant l'induction.

Une réaction d'indice ≥ 1 chez les animaux du groupe traité a indiqué généralement une sensibilisation si les animaux du groupe témoin ont montré des réactions < 1.

Si les animaux témoins ont présenté des réactions d'indice ≥ 1, les réactions des animaux traités supérieures à la réaction la plus grave chez les témoins ont été considérées comme des réactions de sensibilisation.

La substance testé a été classe dans l'une des catégories suivantes en fonction du pourcentage d'animaux réactifs.

Pourcentage d'animaux réactifs*	Degré d'allergénicité	
0 - 10	I	non sensibilisant
11 - 30	II	faiblement sensibilisant
31 - 60	III	moyennement sensibilisant
61 - 80	IV	fortement sensibilisant
81 - 100	V	très fortement sensibilisant

* Le classement de la substance a été basé sur la valeur la plus élevée des 3 pourcentages d'animaux réactifs définis 48, 72 et 96 heures après application.

6.5. Vérification de la sensibilité et de la fiabilité de la méthode

La sensibilité et la fiabilité de la technique expérimentale ont été vérifiées au cours le l'étude Te 670 du 10 novembre au 4 décembre 1998 à l'aide d'une substance de référence connue pour avoir un potentiel sensibilisant cutané = le 2-mercapto- benzothiazole (N° CAS 149-30-4 / N° EINECS 205-736-8 - dénomination usuelle : Kaptax) utilisé dans les conditions suivantes :

CMI_{ID} = 1 % dans l'huile d'olive,
CMI_{T} = 25 % dans la vaseline + irritation cutanée au lauryl sulfate de sodium,
CMNI = 2 et 5 % dans la vaseline.
Le pourcentage d'animaux réactifs lors de l'épreuve déclenchante a été égal à 100 %.

7. RESULTATS

7.1. Essais préliminaires

Les réactions cutanées observées lors de la détermination de la CMI_{ID} sont regroupées en Annexe I.

La CMI_{ID} retenue a été égale 0,25 % dans l'eau PPI.

Les réactions cutanées observées lors de la détermination des CMI_T et CMNI sont regroupées en Annexe II.

La CMI_T retenue a été égale à 0,5 % dans l'eau PPI.

Par ailleurs le Directeur d'études a retenu la nécessité d'induire une irritation préalable avec du lauryl sulfate de sodium pour l'exposition inductrice par voie topique lors de l'essai proprement dit.

La CMNI retenue a été égale à 0,5 % dans l'eau PPI.

La CMNI/2 retenue a été égale à 0,25 % dans l'eau PPI.

7.2. Essai proprement dit

Les poids individuels des animaux à J1 et à J25 sont fournis en Annexe III.

Les réactions cutanées observées lors de l'exposition déclenchante sont regroupées en Annexe IV.

8. CONCLUSION

Compte tenu des critères de jugement adoptés, la substance **ALKAZYME** a été classée **non sensibilisante** par contact avec la peau (classe 1).

17.02.99

Patrick GOMOND
Directeur d'Etudes

19.02.99

p.o. **Philippe MASSON**
Biologiste
Directeur du Laboratoire d'Essais

18-02-99

Nathalie DROSS
Responsable Assurance Qualité

Annexe I

Confirmation de la CMI_{ID}

Véhicule = Eau PPI (Méram lot 88558)

N° des animaux	Réactions cutanées* en fonction de la concentration							
	0,5 %		0,25 %		0,125 %		0,0625 %	
	E	0	E	0	E	0	E	0
2075	2	1	2	1	2	1	1	0
2076	3	1	2	1	2	1	1	0

*Légende : échelle de cotation**

0 : pas de modification visible

1 : érythème discret ou en taches

2 : érythème modéré et confluent

3 : érythème intense et tuméfaction

Annexe II

Confirmation des CMI_T et CMNI

Véhicule = Eau PPI (Méram lot 88558)

N° des animaux	Réactions cutanées* en fonction de la concentration							
	0,5 %		0,25 %		0,125 %		0,0625 %	
	E	O	E	O	E	O	E	O
2282	0	0	0	0	0	0	0	0
2283	0	0	0	0	0	0	0	0
2318	0	0	0	0	0	0	0	0

*Légende : échelle de cotation**

0 : pas de modification visible

1 : érythème discret ou en taches

2 : érythème modéré et confluent

3 : érythème intense et tuméfaction

Annexe III

Poids Corporel

Lot 1 : groupe témoin

N° des animaux	Poids (en g)		
	J1	J32	J32-J1
2409	366.1	543.4	177.3
2410	314.7	495.4	180.7
2411	377.3	527.7	150.4
2412	354.2	563.1	208.9
2413	348.6	520.2	171.6
2414	369.9	552.6	182.7
2415	326.8	483.1	156.3
2416	343.6	520.3	176.7
2417	361.8	518.3	156.5
2418	351.4	482.7	131.3
Moyenne	351.44	520.68	169.24
Ecart-type	19.34	27.66	21.44

Lot 2 : groupe traité

N° des animaux	Poids (en g)		
	J1	J32	J32-J1
2419	350.2	478.1	127.9
2420	326.7	489.4	162.7
2421	341.3	553.3	212.0
2422	350.6	504.8	154.2
2423	360.4	544.2	183.8
2424	364.4	524.2	159.8
2425	353.7	545.2	191.5
2426	336.2	548.6	212.4
2427	383.6	549.6	166.0
2428	329.0	519.2	190.2
2429	365.6	505.4	139.8
2430	340.1	512.0	171.9
2431	355.5	562.0	206.5
2432	360.0	567.8	207.8
2433	360.1	467.5	107.4
2434	347.5	516.6	169.1
2435	370.9	524.8	153.9
2436	374.7	502.5	127.8
2437	366.2	515.9	149.7
2438	381.8	535.1	153.3
Moyenne	355.93	523.31	167.39
Ecart-type	16.07	27.54	29.92

Annexe IV

Exposition déclenchante

Lot 1 : groupe témoin — Véhicule = eau PPI (Méram lot 88558)

N° des animaux	Réactions cutanées* en fonction de la concentration et du temps de lecture					
	0,5 %			0,25 %		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
2409	0	0	0	0	0	0
2410	0	0	0	0	0	0
2411	0	0	0	0	0	0
2412	0	0	0	0	0	0
2413	0	0	0	0	0	0
2414	0	0	0	0	0	0
2415	0	0	0	0	0	0
2416	0	0	0	0	0	0
2417	0	0	0	0	0	0
2418	0	0	0	0	0	0
% anx réactifs	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Lot 2 : groupe traité — Véhicule = eau PPI (Méram lot 88558)

N° des animaux	Réactions cutanées* en fonction de la concentration et du temps de lecture					
	0,5 %			0,25 %		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
2419	0	0	0	0	0	0
2420	0	0	0	0	0	0
2421	0	0	0	0	0	0
2422	0	0	0	0	0	0
2423	0	0	0	0	0	0
2424	0	0	0	0	0	0
2425	0	0	0	0	0	0
2426	0	0	0	0	0	0
2427	0	0	0	0	0	0
2428	0	0	0	0	0	0
2429	0	0	0	0	0	0
2430	0	0	0	0	0	0
2431	0	0	0	0	0	0
2432	0	0	0	0	0	0
2433	0	0	0	0	0	0
2434	0	0	0	0	0	0
2435	0	0	0	0	0	0
2436	0	0	0	0	0	0
2437	0	0	0	0	0	0
2438	0	0	0	0	0	0
% anx réactifs	0%	0%	0%	0%	0%	0%

*Légende : échelle de cotation**
0 : pas de modification visible
1 : érythème discret ou en taches
2 : érythème modéré et confluent
3 : érythème intense et tuméfaction

IANESCO
ANALYSES • PRÉLÈVEMENTS
ÉTUDES • CONSEILS
environnement • matériaux au contact des aliments

IRFAQ
Madame Brigitte COTTIN-RIVIERE
4 BIS RUE CAROL HEITZ
86000 POITIERS

V/Réf : Commande N° 12CDE499
N/Réf : DA-12/02111-1 du 22/03/2012
Copie : /

RAPPORT D'ESSAIS RE-12/10836 du 13 août 2012

I- OBJET :

Test d'écotoxicité sur un produit.
Détermination de la toxicité sur les poissons selon OCDE 203.

II- REFERENCE ECHANTILLON :

1- **Réf. 1203099 - Détergent pré-désinfectant protéolytique alcalin (pH 10,5)**
Lot 2011.09.01.44 - Date péremption 2014.09

Réceptionné au laboratoire le 22/03/2012

Prélèvement non effectué par IANESCO.

III- RESULTATS :

Voir rapport d'essais du sous-traitant (BFB - Laboratoire d'Analyses de Fluides) en annexe.

Philippe NOMPEX
Responsable Physico-chimie et Microbiologie

La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous sa forme intégrale. Il comporte 1 page et 1 annexe (6 pages).
Les résultats mentionnés ne sont applicables qu'aux échantillons soumis à IANESCO. Incertitudes communiquées sur demande.

BfB
Laboratoire d'Analyses de Fluides

Parc Scientifique Créalys
Rue Phocas Lejeune, 10
5032 Isnes (Belgique)
info@bfblab.com
Tél. + 32.81.58.53.00
Fax + 32.81.58.53.08

Rapport d'essai:
Test verslag: IA115418.01.01 Page 1/6
Test report:

BfB code: 115418

Client:
Klant:
Customer:

IANESCO
Att.: Mr Philippe Nompex
Rue Carol Heitz, 6
F – 90974 Poitiers Cedex
France

Date d'arrivée:
Ontvangstdatum:
Date of receipt: 22/06/2012

Date d'émission du rapport:
Rapport verzendingsdatum:
Report emission date: 26/04/2012

Cher Monsieur,

Veuillez trouver ci-après le rapport d'essai concernant l'échantillon suivant:

Code BfB	Référence client	Conditionnement
115418	12/02111-1 230312	250 ml de poudre dans un contenant en plastique

[B] Poisson, essai de toxicité aiguë (OECD 203)

Essai limite

Date de début du test: 09/07/2012

Principe

Détermination, dans des conditions définies, du taux de mortalité d'une population de *Danio rerio* exposée pendant 24 heures, 48 heures, 72 heures et 96 heures à une concentration de la substance à tester.

Si le taux de mortalité calculé à l'issue de l'essai est quasi nul (au maximum égal à 10%), on considère que la CL_{50}-96h se situe au-delà de ladite concentration en substance d'essai.

B : ISO 17025 accredited test by Belac

Observation : Ce rapport ne peut être reproduit partiellement, ni utilisé et mentionné dans un but de publicité quelqu'il soit, sans l'approbation écrite de la direction de BfB.
Ce rapport d'essai est d'ailleurs uniquement valable pour la société mandante et ne concerne que les échantillons soumis à l'essai.
Aanmerking : Dit rapport mag noch gebruikt, noch vermeld worden voor om het even welke reklame doeleinden, zonder voorafgaandelijke goedkeuring van de directie van BfB
Dit rapport is enkel geldig voor de door ons geanalyseerde monsters en alleen bruikbaar door de lastgever.
Remark : This report may not be reproduced even partially, nor be used or mention be made in publicity without written approval from BfB director.
This report concerns exclusively sample and is only dedicated tot he constituent
Doc/05/RE-05-10

ISO 17025 Accredited
BELAC n°044-TEST

BfB Laboratoire d'Analyses de Fluides

Parc Scientifique Créalys
Rue Phocas Lejeune, 10
5032 Isnes (Belgique)
info@bfblab.com
Tél. + 32.81.58.53.00
Fax + 32.81.58.53.08

Méthode

Ligne directrice 203 de l'OCDE (Partie I): Poisson, Essai de Toxicité Aiguë

Dernière version à ce jour.

Informations et propriétés de la substance d'essai

Formule chimique:	information non transmise par le client
Pureté:	information non transmise par le client
Etat physique:	poudre
Couleur:	blanche
Stabilité dans l'eau:	information non transmise par le client
Stabilité à la lumière:	information non transmise par le client
Poe:	information non transmise par le client
pKa:	non applicable
Pression de vapeur:	non applicable

Résultats de biodégradabilité facile (selon l'OECD 301): information non transmise par le client

Informations sur l'organisme soumis à l'essai

Espèce: *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*).
Origine: Bassler Biofish, stationstraat, 130, 2235 Westmerbeek
Taille: Les poissons destinés à l'essai ont été acclimatés pendant au moins 7 jours et possèdent une longueur totale de 25mm à 30mm.
Paramètres d'acclimatation: Les paramètres d'acclimatation sont identiques à ceux de l'essai.
Date de début d'acclimatation: 28/06/2012

B : ISO 17025 accredited test by Belac

Observation : Ce rapport ne peut être reproduit partiellement, ni utilisé et mentionné dans un but de publicité quelqu'il soit, sans l'approbation écrite de la direction de BfB.
Ce rapport d'essai est d'ailleurs uniquement valable pour la société mandante et ne concerne que les échantillons soumis à l'essai.
Aanmerking : Dit rapport mag noch gebruikt, noch vermeld worden voor om het even welke reklame doeleinden, zonder voorafgaandelijke goedkeuring van de directie van BfB
Dit rapport is enkel geldig voor de door ons geanalyseerde monsters en alleen bruikbaar door de lastgever.
Remark : This report may not be reproduced even partially, nor be used or mention be made in publicity without written approval from BfB director.
This report concerns exclusively sample and is only dedicated tot he constituent
Doc/05/RE-05-10

ISO 17025 Accredited
BELAC n°044-TEST

BfB Laboratoire d'Analyses de Fluides

Parc Scientifique Créalys
Rue Phocas Lejeune, 10
5032 Isnes (Belgique)
info@bfblab.com
Tél. + 32.81.58.53.00
Fax + 32.81.58.53.08

Eau de dilution

L'eau de dilution (eau pour test) est préparée selon les indications de la ligne directrice 203 de l'OECD. Sa composition est détaillée dans le tableau suivant:

Substance	Concentration massique dans l'eau de dilution
$CaCl_2.2H_2O$	294 mg/l
$MgSO_4.7H_2O$	123 mg/l
$NaHCO_3$	64,8 mg/l
KCl	5,75 mg/l

La dureté de l'eau de dilution est comprise entre 200 et 250mg $CaCO_3$/l.

Préparation du témoin et de la solution d'essai

Une solution mère est préparée par dissolution d'une quantité connue de substance d'essai dans de l'eau pour test.

La solution d'essai est préparée par dilution de la solution mère avec de l'eau pour test.

Le récipient témoin est obtenu par remplissage d'une cuve, exclusivement avec de l'eau pour test.

Le récipient d'essai est obtenu par remplissage d'une cuve avec la solution d'essai.

Lorsque la température des solutions atteint 23°C ± 1°C, 7 poissons sont transférés dans chacune des cuves. Le rapport massique en poissons est de maximum1 $g.l^{-1}$ dans chaque cuve.

L'essai est réalisé selon la méthode "statique" mais en assurant l'aération la solution de chaque cuve par un léger bullage avec de l'air ambiant.

B : ISO 17025 accredited test by Belac

Observation : Ce rapport ne peut être reproduit partiellement, ni utilisé et mentionné dans un but de publicité quelqu'il soit, sans l'approbation écrite de la direction de BfB.
Ce rapport d'essai est d'ailleurs uniquement valable pour la société mandante et ne concerne que les échantillons soumis à l'essai.
Aanmerking : Dit rapport mag noch gebruikt, noch vermeld worden voor om het even welke reklame doeleinden, zonder voorafgaandelijke goedkeuring van de directie van BfB
Dit rapport is enkel geldig voor de door ons geanalyseerde monsters en alleen bruikbaar door de lastgever.
Remark : This report may not be reproduced even partially, nor be used or mention be made in publicity without written approval from BfB director.
This report concerns exclusively sample and is only dedicated tot he constituent Doc/05/RE-05-10

ISO 17025 Accredited
BELAC n°044-TEST

BfB Laboratoire d'Analyses de Fluides

Parc Scientifique Créalys
Rue Phocas Lejeune, 10
5032 Isnes (Belgique)
info@bfblab.com
Tél. + 32.81.58.53.00
Fax + 32.81.58.53.08

Incubation

Les cuves sont placées dans une enceinte thermostatique dont la température est consignée à 23°C ± 1°C et sont soumises à une photopériode de 16 heures par un éclairage artificiel.

Variation du pH

L'eau de dilution possède un pH de 7,8 ± 0,2.

Le pH est mesuré quotidiennement dans le témoin et la solution d'essai. La variation du pH n'a pas dépassé 0,2 unité au cours de l'essai.

Evolution de la concentration en oxygène dissous

La concentration en oxygène dissous dans l'eau de dilution est supérieure à 90% de la valeur de saturation dans l'eau (≥ 8,1mg/l).

Le taux d'oxygène dissous est mesuré quotidiennement dans le témoin et la solution d'essai. Les résultats sont collationnés dans le tableau suivant:

Teneur en oxygène dissous dans l'eau de dilution: 8,6 mg/l

Taux de charge (g/l)	0	0,01
O_2 à 0 heure (mg/l)	8,6	8,4
O_2 à 24 heures (mg/l)	7,8	7,5
O_2 à 48 heures (mg/l)	7,7	6,7
O_2 à 72 heures (mg/l)	7,9	7,5
O_2 à 96 heures (mg/l)	7,1	7,1

Les teneurs en oxygène mesurées au cours de l'essai n'ont pas été inférieures à 60% de la valeur de saturation dans l'eau (60% * 9mg/l = 5,4mg/l).

B : ISO 17025 accredited test by Belac

Observation : Ce rapport ne peut être reproduit partiellement, ni utilisé et mentionné dans un but de publicité quelqu'il soit, sans l'approbation écrite de la direction de BfB.
Ce rapport d'essai est d'ailleurs uniquement valable pour la société mandante et ne concerne que les échantillons soumis à l'essai.
Aanmerking : Dit rapport mag noch gebruikt, noch vermeld worden voor om het even welke reklame doeleinden, zonder voorafgaandelijke goedkeuring van de directie van BfB
Dit rapport is enkel geldig voor de door ons geanalyseerde monsters en alleen bruikbaar door de lastgever.
Remark : This report may not be reproduced even partially, nor be used or mention be made in publicity without written approval from BfB director.
This report concerns exclusively sample and is only dedicated tot he constituent

Doc/05/RE-05-10

ISO 17025 Accredited
BELAC n°044-TEST

BfB Laboratoire d'Analyses de Fluides

Parc Scientifique Créalys
Rue Phocas Lejeune, 10
5032 Isnes (Belgique)
info@bfblab.com
Tél. + 32.81.58.53.00
Fax + 32.81.58.53.08

Observations

Les poissons n'ont pas présenté de comportement anormal dans les conditions de l'essai et aucun effet externe visible n'est à signaler.

Aucun incident technique n'est survenu au cours de l'essai.

Mortalité

Un essai préliminaire a été réalisé (le 26/06/2012) avec 3 poissons à la concentration de 0.10g.l^{-1} .
La mortalité des poissons est de 100% après 3 heures d'exposition à cette concentration.

Un essai limite a été réalisé à la concentration de 0.01g.l^{-1} en substance d'essai.
Le taux de mortalité dans chaque lot est calculé sur base de 7 individus. Le taux de mortalité calculé dans le lot témoin n'est pas supérieur à 10%.

Le tableau ci-dessous reprend les valeurs de la mortalité cumulée (%) des poissons après 24 heures, 48 heures, 72 heures et 96 heures d'exposition:

Taux de charge (g/l)	0	0,01
Mortalité à 24 heures (%)	0	0
Mortalité à 48 heures (%)	0	0
Mortalité à 72 heures (%)	0	0
Mortalité à 96 heures (%)	0	0

Résultats finaux

Les résultats obtenus sont basés sur les concentrations nominales.

Le taux de mortalité calculé à l'issue de l'essai est de 0 %à la concentration de 0.01g.l^{-1} et de 100% à la concentration de 0.10g.l^{-1}, on peut donc conclure que:

La CL_{50}-96h se situe entre 0.10g.l^{-1} et 0.01g.l^{-1}

B : ISO 17025 accredited test by Belac

Observation : Ce rapport ne peut être reproduit partiellement, ni utilisé et mentionné dans un but de publicité quelqu'il soit, sans l'approbation écrite de la direction de BfB.
Ce rapport d'essai est d'ailleurs uniquement valable pour la société mandante et ne concerne que les échantillons soumis à l'essai.
Aanmerking : Dit rapport mag noch gebruikt, noch vermeld worden voor om het even welke reklame doeleinden, zonder voorafgaandelijke goedkeuring van de directie van BfB
Dit rapport is enkel geldig voor de door ons geanalyseerde monsters en alleen bruikbaar door de lastgever.
Remark : This report may not be reproduced even partially, nor be used or mention be made in publicity without written approval from BfB director.
This report concerns exclusively sample and is only dedicated tot he constituent
Doc/05/RE-05-10

ISO 17025 Accredited BELAC n°044-TEST

BfB Laboratoire d'Analyses de Fluides

Parc Scientifique Créalys
Rue Phocas Lejeune, 10
5032 Isnes (Belgique)
info@bfblab.com
Tél. + 32.81.58.53.00
Fax + 32.81.58.53.08

Conclusion

La substance d'essai ne présente pas de toxicité aiguë vis-à-vis des poissons, à la concentration testée.

Cette indication toxicologique est obtenue à partir d'une expérimentation réalisée en laboratoire dans des conditions types définies. Elle donne une indication du danger potentiel mais ne peut être utilisée directement pour prévoir les effets dans un environnement naturel.

BfB Oil Research S.A.
Parc scientifique Crealys
rue Phocas Lejeune 10
B - 5032 Gembloux
☎ + 32.81.58.53.00 🖷 + 32.81.58.53.08
✉ info@bfblab.com

Vincent Bouillon
Directeur Opérationnel

B : ISO 17025 accredited test by Belac

Observation : Ce rapport ne peut être reproduit partiellement, ni utilisé et mentionné dans un but de publicité quelqu'il soit, sans l'approbation écrite de la direction de BfB.
Ce rapport d'essai est d'ailleurs uniquement valable pour la société mandante et ne concerne que les échantillons soumis à l'essai.
Aanmerking : Dit rapport mag noch gebruikt, noch vermeld worden voor om het even welke reklame doeleinden, zonder voorafgaandelijke goedkeuring van de directie van BfB
Dit rapport is enkel geldig voor de door ons geanalyseerde monsters en alleen bruikbaar door de lastgever.
Remark : This report may not be reproduced even partially, nor be used or mention be made in publicity without written approval from BfB director.
This report concerns exclusively sample and is only dedicated tot he constituent
Doc/05/RE-05-10

ISO 17025 Accredited
BELAC n°044-TEST

IANESCO
ANALYSES • PRÉLÈVEMENTS
ÉTUDES • CONSEILS
environnement • matériaux au contact des aliments

V/Réf . : Commande N° 12CDE474 du 17/04/2012
N/Réf . : **DA-12/02111-1** *du* **22/03/2012**

IRFAQ
Madame COTTIN-RIVIERE Brigitte
4 BIS RUE CAROL HEITZ

86000 POITIERS

RAPPORT D'ESSAIS n° RE-12/06203 du 22 mai 2012

1. OBJET

Test d'ecotoxicité sur un produit.
Complément au rapport d'essais n° RE-12/04425 du 13 avril 2012.

2. REFERENCE ECHANTILLON

1- **Réf. 1203099 - Détergent pré-désinfectant protéolytique alcalin (pH 10,5) Lot 2011.09.01.44 - Date péremption 2014.09**
- Début des essais le : 04/04/2012
Prélèvement(s) non effectué(s) par le laboratoire IANESCO.

Echantillon réceptionné au laboratoire le 22 mars 2012 .

3. RESULTATS

Paramètres	Méthodes	Résultats	Unités
- TOXICITÉ VIS-À-VIS DES DAPHNIES -			
Inhibition de croissance d'algues vertes : CEr10-72H	NF EN ISO 8692 (calcul)	6.4	mg/L
Inhibition de croissance d'algues vertes : CEr50-72H	NF EN ISO 8692 (calcul)	39.6	mg/L
Toxicité vis-à-vis des daphnies, CE50i-48H	NF EN ISO 6341 (calcul)	2.90	mg/L

TEST DE TOXICITE VIS-A-VIS DES DAPHNIES :
- Les conditions de réalisation des essais de toxicité vis-à-vis des daphnies sont décrites dans le document joint en annexe 1.

TEST D'INHIBITION DE LA CROISSANCE D'ALGUES VERTES :
- Les conditions de réalisation de l'essai d'inhibition de la croissance des algues vertes sont décrites dans les documents joints en annexes 2-1 à 2-4.

Philippe NOMPEX
Responsable Physico-chimie et Microbiologie

La reproduction de ce rapport d'essais n'est autorisée que sous sa forme intégrale.
Il comporte 1 page(s). Les résultats mentionnés ne sont applicables qu'aux échantillons soumis à IANESCO.

IANESCO

Annexe 1 du rapport d'essai n° RE-12/06203 du 22/05/2012 concernant la détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna Straus*

(norme NF EN ISO 6341 de Mai 1996)

Echantillon :

Référence IANESCO	Client	Référence Client
DA-12/2111-1	IRFAQ	1203099 - Détergent pré-désinfectant protéolytique alcalin
Date de prélèvement	**Date de réception**	**Date d'analyse**
-	22-03-12	03-04-12
Conservation	**Traitement avant analyse**	
Température ambiante	Pesée de l'échantillon et dilution dans l'eau de dilution suivant la norme NF EN ISO 6341	

Données relatives à l'élevage :

Daphnies issues de l'élevage du laboratoire âgées de moins de 24 heures, Mères âgées de 3 à 6 semaines

Essais :

Essai préliminaire		Essai définitif	
[concentration] mg/l	Immobilisation %	[concentration] mg/l	Immobilisation %
0	0	0	0
50	100	0,5	0
125	100	1	10
250	100	2,5	55
500	100	5	90
1000	100	10	100
2000	100	20	100
5000	100	40	100
10000	100	60	100

CE50i-48h = 2.90 mg/L

(Calcul à partir de la courbe Gausso-logarithmique)**Données relatives à l'essai définitif :**

Concentration minimale correspondant à 100 % d'immobilisation	Concentration maximale correspondant à 0 % d'immobilisation
10 mg/l	0,5 mg/l

Paramètres pour la validité des essais (essai définitif) :

	Valeur de l'oxygène dissous de la plus faible concentration immobilisant le maximum de daphnies	Pourcentage d'immobilisation du témoin	CE50i-24h du dichromate de potassium
Résultats	8.70 mg/l	0 %	1,30 mg/l
Tolérance	Supérieure ou égale à 2 mg/l	Inférieur ou égal à 10 %	Entre 0,6 et 1,7 mg/l

CE50i-48h (Concentration Efficace Initiale inhibitrice) = Concentration qui immobilise 50 % de *Daphnia magna* en 48 heures.

COT dans les solutions d'essais

La composition de l'échantillon n'est pas connue. Le COT est habituellement suivi pour détecter une éventuelle dégradation de l'échantillon au cours du test. Cependant les valeurs en COT sont trop faibles pour être significatives.

Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes selon la norme NF EN ISO 8692 Mai 2005

IANESCO

ANNEXE 2-1 au rapport d'essais n° 12/06203 du 22 mai 2012

Référence de l'échantillon

Echantillon : DA 12/2111-1

Détergent pré-désinfectant protéolytique alcalin

Organisme d'essai

Pseudokirchneriella subcapitata (Korshikov)Hindak
Souche n° CCAP 278/4 issue du Museum Nationale d'Histoire Naturelle
Cultivé dans milieu B3N

Date de l'essai

du 23 au 26 avril 2012

Méthode

Préparation de 7 concentrations d'échantillon différentes , 2 essais par concentration , ajout de sels nutritifs dans les dilutions

Echantillon pour essai : 50ml d'échantillon et 1ml d'inoculum d'algues

Température minimale au cours de l'essai : 23°C

Température maximale au cours de l'essai : 25°C

Méthode de mesurage des concentrations cellulaires : Comptage sur cellule au microscope

Méthode de calcul de la CE50 : Méthode Gausso logarithmique

pH dans les solutions d'essai

	Essai Témoin	Essai 1mg/l	Essai 2mg/l	Essai 5mg/l	Essai 10mg/l	Essai 20mg/l	Essai 50mg/l	Essai 100mg/l
pH initial	6,5	6,5	6,5	6,55	6,6	6,65	6,85	7,15
pH final	6,8	6,85	6,85	6,8	6,8	6,8	6,9	7,25

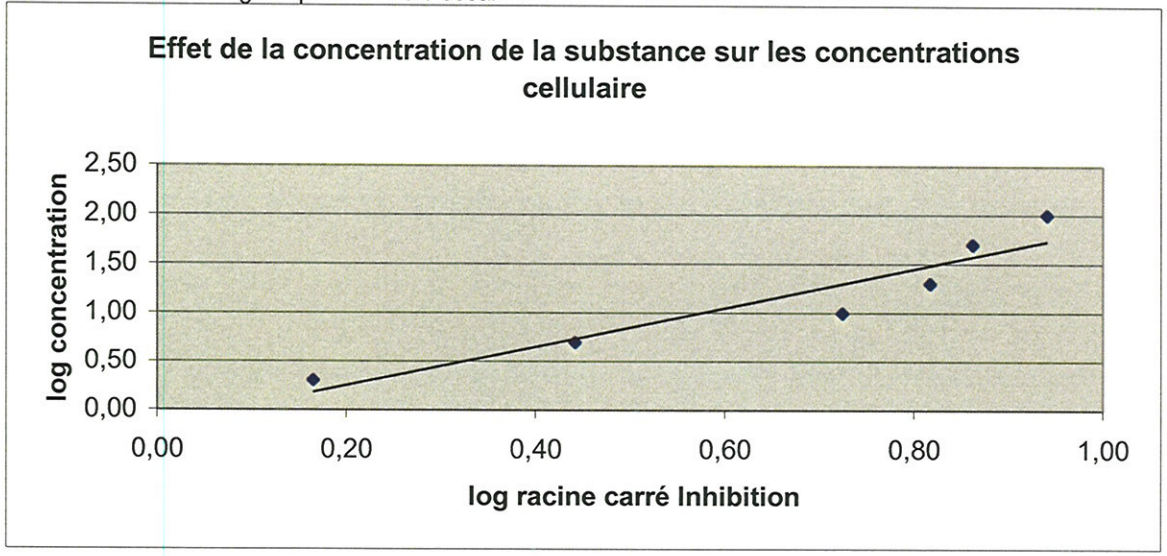
Tolérance pour la validité de l'essai : différence entre le pH initial et final <1,5

Résultats

Temps en jours	Concentrations cellulaires des essais															
	Témoin		1 mg/L		2 mg/L		5 mg/L		10 mg/L		20 mg/L		50 mg/L		100 mg/L	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
0	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
1	78000	68000	52000	68000	48000	48000	68000	68000	32000	44000	36000	36000	8000	4000	8000	8000
2	590000	410000	470000	500000	340000	410000	470000	470000	190000	190000	160000	120000	20000	30000	10000	10000
3	2500000	2400000	2040000	2060000	2000000	2100000	1520000	1520000	480000	480000	220000	200000	100000	120000	40000	40000

Temps en jours	Moyenne des concentrations cellulaires* des essais							
	Essai Témoin	Essai 1mg/l	Essai 2mg/l	Essai 5mg/l	Essai 10mg/l	Essai 20mg/l	Essai 50mg/l	Essai 100mg/l
	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
1	73000	60000	48000	68000	38000	36000	6000	8000
2	500000	485000	375000	470000	190000	140000	25000	10000
3	2450000	2050000	2050000	1520000	480000	210000	110000	40000

*nombre d'algues par milliitre d'essai

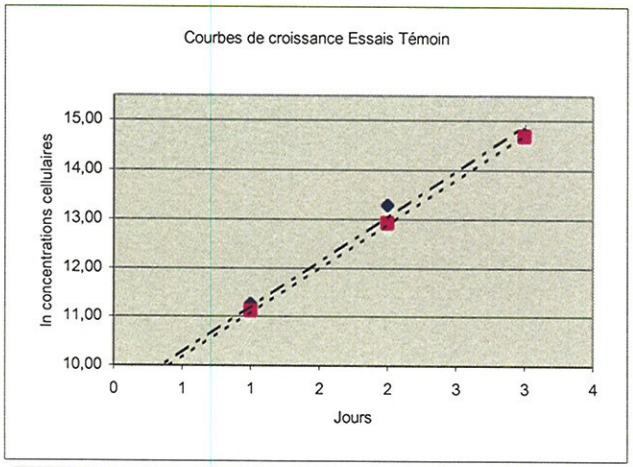


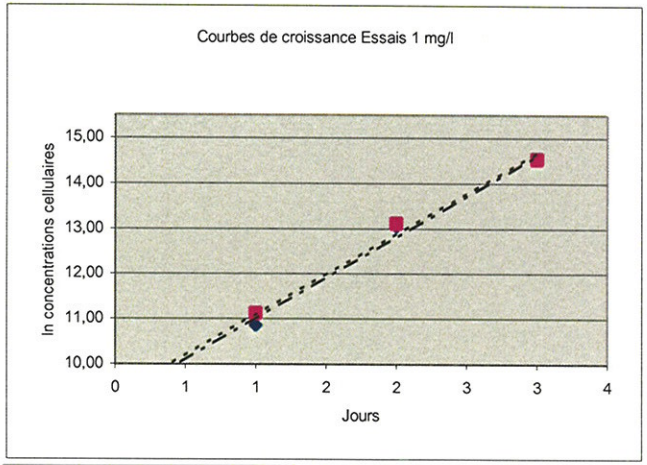
CE_{r50} = 39,6 mg/L
CE_{r10} = 6,4 mg/L

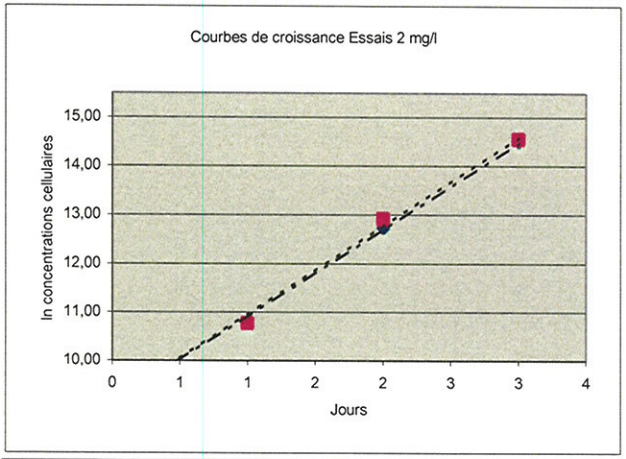
L'échantillon est TOXIQUE.

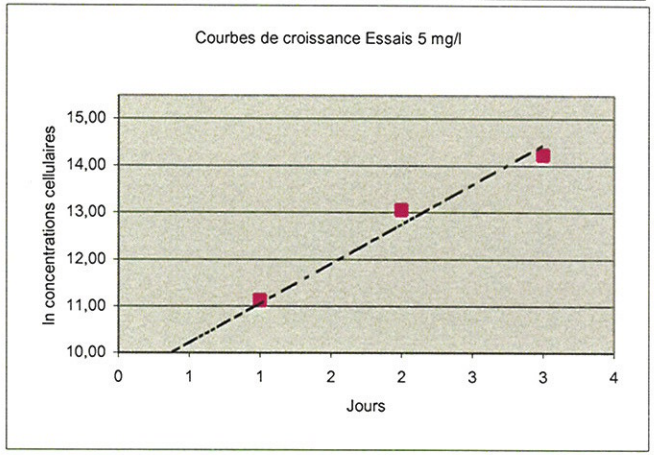
La CEr_{50} est la concentation de l'échantillon analysé qui entraîne une diminution de 50% du taux de croissance des algues par rapport aux solutions témoins
La CEr_{10} est la concentation de l'échantillon analysé qui entraîne une diminution de 10% du taux de croissance des algues par rapport aux solutions témoins

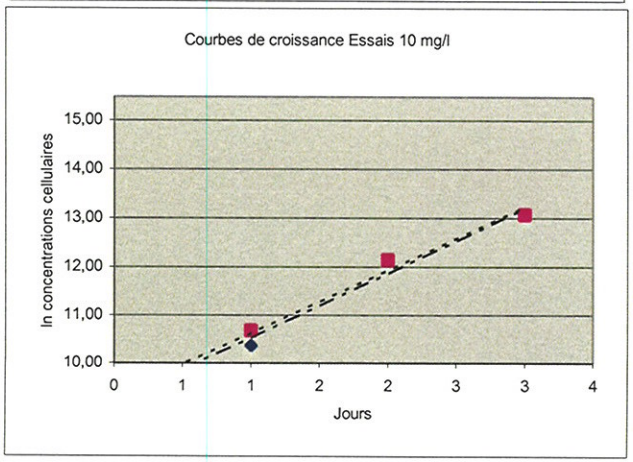
Courbes de croissance

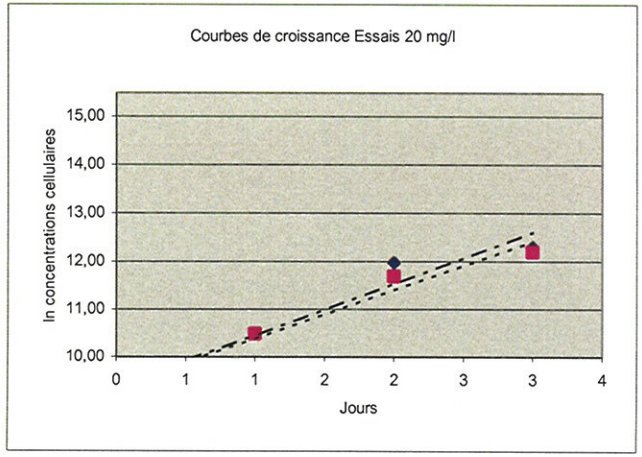


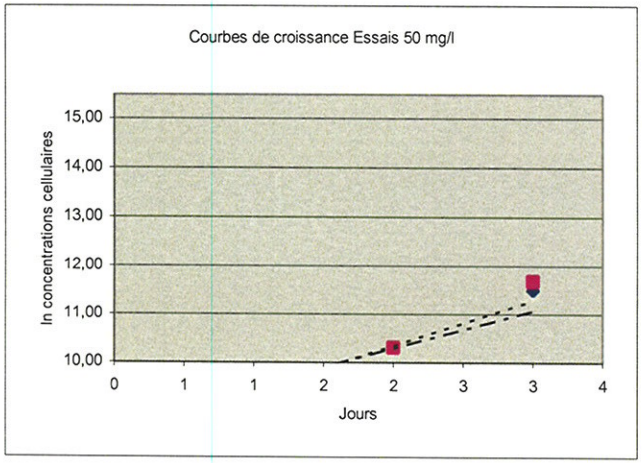


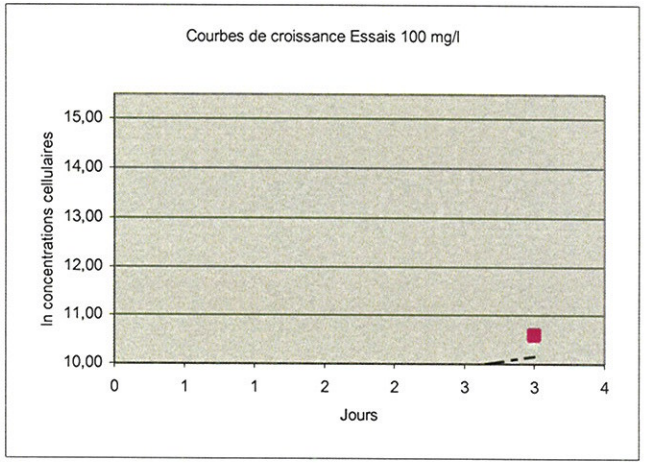









Courbes de croissance Essais 50 mg/l
ln concentrations cellulaires
15,00
14,00
13,00
12,00
11,00
10,00
0
1
1
2
2
3
3
4
Jours


Courbes de croissance Essais 100 mg/l
ln concentrations cellulaires
15,00
14,00
13,00
12,00
11,00
10,00
0
1
1
2
2
3
3
4
Jours

REFERENCIAS

Código: Devis 7-FLE-1-7-05-890 **Presupuesto**: 7-FLE-1-7-05-890 **Recibido en Rouen el** 15/12/05 **Solicitante**: Sr. Salkind **Identif. del cliente**: ALKAZYME Lot 2005.09.06.44 **Descripción:** detergente predesinfectante de dispositivos médicos **Naturaleza:** ALKAZYME **Comentario:** determinación de la biodegradabilidad intrínseca aerobia Nº de lote: 2005.09.06.44	**ALKAPHARM** Avenue Amiral Lemonnier 30 78160 Marly le Roi A la atención del Sr. Salkind
	En Rouen, a 16 de enero de 2006
	INFORME DE ENSAYO **RNO5-10014.002** Página 1 de 3 Revisión 1

El presente documento anula y sustituye al documento con el mismo número que se emitió anteriormente, el cual deberá destruirse o devolverse al laboratorio.

Parámetro:

Biodegradabilidad intrínseca aerobia
Ensayo de desaparición del COD (Zahn-Wellens)
OCDE 302 B

Principio: Se agita y expone al aire una mezcla con la sustancia de ensayo, sustancias nutritivas minerales y una proporción relativamente importante de lodo activado en medio acuoso a una temperatura de entre 20 y 25 º C en la oscuridad o expuesta a la luz difusa durante un periodo que puede ampliarse hasta los 28 días. Al proceso de biodegradación le sigue una dosis de Carbono Orgánico Disuelto a lo largo del periodo.

Inóculo bacteriano: Lodos y efluente de la planta depuradora de Rouen. Recuperación de los flóculos bacterianos tras someterlos a centrifugación y suspensión en el medio de ensayo. La proporción entre el inóculo (con materias en suspensión) y la sustancia de ensayo (con Carbono Orgánico Disuelto) se sitúa entre 2,5:1 y 4,0:1 en los frascos de ensayo.

(1) Ensayo sometido a un tratamiento secundario en el laboratorio de SGS (2) Ensayo sometido a un tratamiento secundario en un laboratorio colaborador. El presente informe de ensayo tan sólo concierne a los objetos o productos sometidos a ensayo. Tan sólo se autoriza la reproducción íntegra del presente documento, salvo acuerdo por escrito por parte del laboratorio. La Sociedad emite el presente informe de conformidad con sus Condiciones Generales de Servicios (copia disponible previa solicitud).

El presente documento anula y sustituye al documento con el mismo número que se emitió anteriormente, el cual deberá destruirse o devolverse al laboratorio.

Muestra: - ALKAZYME lot 2005.09.06.44
- Modo de conservación antes del ensayo: temperatura ambiente

Datos del análisis:

D=0: 15/12/2005
D=4: 19/12/2005
D=6: 21/12/2005
D=14: 29/12/2005
D=21: 05/01/2006
D=28: 12/01/2006

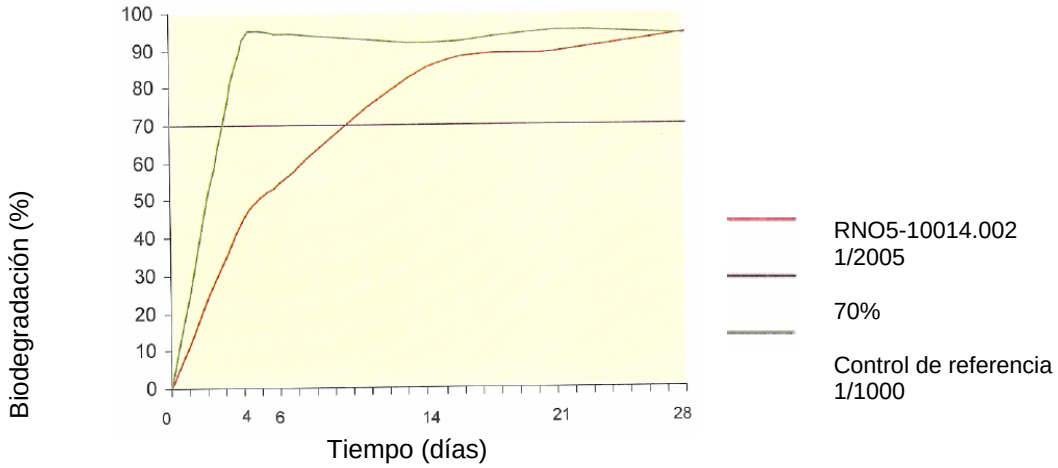
Resultados:

Índice de biodegradación en porcentajes en función del tiempo:

Tiempo en días	0	4	6	14	21	28
Control de referencia	0	**92,6**	**94,5**	**92,0**	**95,0**	**93,9**
RN05.10014.002	0	**45,0**	**54,6**	**85,4**	**89,5**	**94,2**

El presente documento anula y sustituye al documento con el mismo número que se emitió anteriormente, el cual deberá destruirse o devolverse al laboratorio.

Índice de biodegradación en función del tiempo
OCDE 302B



Comentarios:

El control de referencia es una sustancia conocida por su capacidad de biodegradación y permite confirmar el experimento global (se obtiene más del 90 % de degradación en 28 días, por lo que la experiencia se desarrolla en condiciones favorables).

Las líneas directrices de la OCDE han fijado dos límites: uno del 20 % de biodegradación que, si se supera, se considerará que la sustancia es intrínsecamente biodegradable; y otro del 70 % que, si se supera, se considerará que la sustancia es totalmente biodegradable. En este análisis en concreto, se observa una biodegradación de la sustancia de ensayo superior al 70 % en un periodo de 28 días (94 %).

En consecuencia, la muestra de ALKAZYME es "**totalmente biodegradable**" según los criterios de la OCDE.

Cédric Hellier
Responsable del proyecto
[*Firma ilegible*]

RAPPORT D'ESSAI

Demandeur :	ALKAPHARM 30, avenue Amiral Lemonier 78160 MARLY-LE-ROI
Date de la demande :	9 septembre 1998
Objet :	Etude de l'action corrosive d'un décontaminant-nettoyant sur les instruments médico-chirurgicaux réutilisables selon la méthode d'essai décrite dans la Norme NF S 94-402/1 Produit ALKAZYME.
Document de référence :	NF S 94-402/1 de décembre 1992.

La reproduction du présent document n'est autorisée que sous sa forme intégrale.
Il comporte 7 pages.

1. IDENTIFICATION DE L'ECHANTILLON

Le produit à tester, accompagné de sa fiche technique, a été envoyé par le demandeur au Laboratoire National d'Essais (L.N.E.) et réceptionné le 15 septembre 1998 au sein de l'Unité Technique Biomédical de la Division 65 :

Nom du produit :	référence commerciale : ALKAZYME
Fabricant :	ALKAPHARM
N° de lot :	803021
Date de fabrication :	non mentionnée
Date d'expiration :	03 01

Caractéristiques du produit :

- type :	poudre
- couleur :	blanche
Couple (concentration, temps) conseillé par le fabricant :	0,5 % - 15 minutes
Température conseillée par le fabricant :	température ambiante
Date de réception au laboratoire :	15/09/98
Condition de stockage au laboratoire :	température (20 ± 2)°C

2. CONDITIONS EXPERIMENTALES

Réalisation des essais : semaines 38 à 43 (1998)

Solution témoin :	eau déminéralisée
pH de la solution témoin :	valeur moyenne : 6,8 (écart-type : 1,2)
Conductivité de la solution témoin	valeur moyenne : 1,6 µs (écart type : 0,6)
Température de la solution témoin	valeur moyenne : 19,3°C (écart type : 0,9)
Concentration de la solution d'essai :	0,5 %
Temps d'immersion :	15 minutes
Température de la solution d'essai :	valeur moyenne : 20,5°C (écart type : 1,2)
Volume des solutions :	1,5 litre

3. CARACTERISTIQUES DES INSTRUMENTS MEDICO-CHIRURGICAUX

Type des instruments utilisés : ciseaux iridectomie droits 10 cm

Références des instruments :

(1) ⎫
(2) ⎬Solution témoin
(3) ⎭
(4) ⎫
(5) ⎬Solution d'essai
(6) ⎭
(7) Instrument témoin

Caractérisation de l'état de surface des instruments :

Référence de l'instrument	Altérations observées
(1)	Petite zone à plus forte rugosité au niveau de la surface interne de chaque branche. Traces d'usinage insuffisamment polies au niveau de l'anneau de chaque branche.
(2)	Fissure et déchirure au niveau du raccordement anneau-branche de chaque branche.
(3)	RAS
(4)	Petite déchirure au niveau du raccordement anneau-branche de la branche gravée.
(5)	Petite zone à plus forte rugosité au niveau de la surface interne de chaque branche.
(6)	Petite déchirure au niveau du raccordement anneau-branche de la branche non gravée.
(7)	RAS

4. RESULTATS DES ESSAIS D'IMMERSION

4.1. SOLUTION TEMOIN

Références des instruments :
(1)
(2)
(3)

Tableau 1 : Liste des altérations observées en fonction du nombre de cycles, quelle que soit leur origine

Nombre de cycles	(1)	(2)	(3)
1	/	/	/
10	/	/	/
20	/	/	/
30	/	/	/
40	/	/	/
50	/	/	/

Ne sont précisées dans les tableaux que les altérations apparues et décelées depuis l'observation précédente.

Tableau 2 : Liste des altérations ne résultant que des essais d'immersion (élimination des altérations résultant de l'état de surface, de la qualité du matériau ou de la conception de l'instrument)

Nombre de cycles	(1)	(2)	(3)
1	/	/	/
10	/	/	/
20	/	/	/
30	/	/	/
40	/	/	/
50	/	/	/

Ne sont précisées dans les tableaux que les altérations apparues et décelées depuis l'observation précédente.

4.2. SOLUTION D'ESSAI

Références des instruments :

(4)
(5)
(6)

Tableau 3 : Liste des altérations observées en fonction du nombre de cycles, quelle que soit leur origine

Nombre de cycles	(4)	(5)	(6)
1	/	/	/
10	Légère coloration brune du marquage laser de la branche gravée.	Légère coloration brune du marquage laser de la branche gravée.	Légère coloration brune du marquage laser de la branche gravée. Coloration brune de stries d'usinage insuffisamment polies au niveau du mors de la branche non gravée.
20	Coloration brune de stries d'usinage insuffisamment polies au niveau du mors de la branche gravée (14ème cycle).	/	/
30	/	/	/
40	/	/	/
50	/	/	/

Ne sont précisées dans les tableaux que les altérations apparues et décelées depuis l'observation précédente.

Tableau 4 : Liste des altérations ne résultant que des essais d'immersion (élimination des altérations résultant de l'état de surface, de la qualité du matériau ou de la conception de l'instrument)

Nombre de cycles	(4)	(5)	(6)
1	/	/	/
10	/	/	/
20	/	/	/
30	/	/	/
40	/	/	/
50	/	/	/

Ne sont précisées dans les tableaux que les altérations apparues et décelées depuis l'observation précédente.

Tableau 5 : Liste des altérations dues au produit testé (élimination des altérations dues au solvant)

Nombre de cycles	(4)	(5)	(6)
1	/	/	/
10	/	/	/
20	/	/	/
30	/	/	/
40	/	/	/
50	/	/	/

Ne sont précisées dans les tableaux que les altérations apparues et décelées depuis l'observation précédente.

suite du rapport page suivante

5. CONCLUSION

Selon les conditions des essais, le produit décontaminant-nettoyant ALKAZYME est non corrosif.

Trappes, le 5 novembre 1998

Réalisation de l'essai
Antonia FAUSSAT

Le Chef de la Division
Expertises et Métallurgie

Danièle JOGUET

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
LABORATOIRE NATIONAL D'ESSAIS

La Responsable Technique

Agnès DUCLERGET

Les résultats mentionnés ne sont applicables qu'aux échantillons, aux produits ou aux matériels soumis au LNE et tels qu'ils sont définis dans le présent document.

Storage study of medical devices in Alkazyme® after use during the weekend

B. Hosten, N. Sut, B. Besnard, G. Nicolaos, A. Fabreguettes
Department of Pharmacy-Sterilization, Robert Ballanger Hospital Centre, 93602, Aulnay Sous Bois

INTRODUCTION

Predisinfection is the first step in the sterilization process. It removes, kills or inhibits the micro-organisms present at that time (AFNOR NFT 72-101). It must be performed immediately after the use of the MD to reduce the initial load and prevent the drying of soil

PURPOSE

As our central sterilization unit is closed on Sundays, instruments are immersed in a pre-disinfectant (Alkazyme®, Alkapharm) for 24 to 48 hours during the weekend. In order to rationalise the immersion of Class I medical devices and assess our practices, we compared the corrosion of these instruments after immersion in Alkazyme® or water.

METHOD

Instruments

Four experimental groups were evaluated: service quality instruments immersed in Alkazyme® or water and operating room quality instruments immersed in Alkazyme® or water. Instruments from the same group were immersed in the same bath. Service quality groups comprised 7 instruments: scalpel handle, scissors, artery forceps, needle holder, nasal speculum, curette and dissecting forceps. Operating room quality groups had the same composition with an additional instrument, a gouge chisel. A comparison of 2 groups of operating room quality was also made with new instruments

Method of evaluation of corrosion

The following immersion times were tested: 20 minutes, 12h, 24h, 48h, and 7 days. Each immersion time was repeated 3 times. The pH and total water hardness (TH) were measured at each immersion. Corrosion was evaluated both macroscopically and microscopically and classified as follows: 1: low corrosion, 2: moderate corrosion; 3: high corrosion.

RESULTS / DISCUSSION

Colonne Gauche

Occurrence of corrosion on used service quality instruments soaked in water

Degree of corrosion 1a

scalpel handle, scissors, artery forceps, needle holder, retractor, curette and dissecting forceps instruments

Legend for all histograms → 20 min 12 h 24 h 48 h 7 days

Degree of corrosion 1b

scalpel handle, scissors, artery forceps, needle holder, retractor, curette and dissecting forceps instruments

Figure 1: Corrosion of used service quality instruments in water 1a and in Alkazyme® 1b. Low (1); moderate (2); high (3).

The results of this study show that:❶/ for service quality instruments immersed in water, 4 out of 7 instruments developed moderate (2) to high (3) corrosion at 24 h,❷/ for service quality instruments immersed in Alkazyme ®, a single instrument developed low corrosion (1) from 24h but no alteration of the instruments was observed at D7.

	20min	12h	24h	48h	7 days
TH Alkazyme	0	0	0	0	0
TH Water	8	30;16; 8	30;8;16	10;8;10	8;28;10

Figure 3: monitoring the of total hardness of the predisinfectant (used instruments)

	20min	12h	24h	48h	7 days
TH Alkazyme	0	0	0	0	0
TH Water	26	16;24;22	32;26;24	22;20;22	22;30;24

Figure 4: Monitoring of total hardness of predisinfectant (new instruments)

Monitoring of TH and pH showed that the water was softer and more alkaline in the Alkazyme® groups (TH = 0; pH = 10 for the Alkazyme® group and TH between 7 and 30 and pH = 7 for the water group), which may explain the lower corrosion in this group.

Colonne Droite

Occurrence of corrosion on used operating room quality instruments soaked in water

Occurrence of corrosion on used operating room quality instruments soaked in Alkazyme

Degree of corrosion

scalpel handle, scissors artery forceps needle holder retractor curette dissecting forceps gouge
instruments

2a 2b

Figure 2: Corrosion of used operating room quality instruments in water 2a and in Alkazyme® 2b

For used operating room quality instruments immersed in water, 6 out of 8 instruments developed moderate (2) to high (3) corrosion at 24 hours whereas for operating room quality instruments immersed in Alkazyme ®, a single instrument developed high corrosion (3) from 24 hours, and two low corrosion (1) at 24 hours, but nothing at D7.

Occurrence of corrosion on used operating room quality instruments immersed in water

Degree of corrosion **No corrosion for new instruments immersed in Alkazyme**

scalpel handle, scissors artery forceps needle holder retractor curette dissecting forceps gouge
instruments

5a 5b

Figure 5: Corrosion of new operating room quality instruments in water 5a and in Alkazyme® 5b

For new operating room quality instruments soaked in water, 2 instruments out of 8 had low corrosion (1) from 12 h and 3 instruments had low (1) to moderate (2) corrosion from 48h. New operating room quality instruments immersed in Alkazyme® showed no corrosion even after 7 days of immersion.

CONCLUSION

1. Our study showed that the corrosion of used instruments immersed in Alkazyme ® is low. These results support our practice of keeping instruments immersed in pre-disinfectant after use, rather than recommending that they are rinsed with water and dried (this step is never optimal) or even stored in water. Water in fact causes significant corrosion of the instruments and therefore accelerates their deterioration.
2. The results obtained with new instruments were even more in favour of soaking them in Alkazyme® rather than in water, and this difference persisted for an immersion time of up to 7 days.
3. The softening of water probably explains this reduced corrosion of instruments immersed in Alkazyme®.

.