

Analyserapport

RAPPORTNUMMER:
925353.1_DRAFT



**TEKNOLOGISK
INSTITUT**

Teknologiparken
Kongsvang Allé 29
DK-8000 Aarhus C
+45 72 20 20 00
Info@teknologisk.dk
www.teknologisk.dk

Side 1 af 13
Bilag 8
Init.: HSA/ENB

- Rekvirent:** Sami Rasmussen
Safe Surface ApS
Industrivej 41 H
8660 Skanderborg
- Emne:** Analyse af den bakteriedræbende effekt af BioCid DESINFICERING fra BioGroup benyttet sammen med Victory electrostatic sprayer blev testet i henhold til en modificeret version af DS/EN 13697:2015+A1:2019. Kvantitativ non-porøs overfladeprøvning til evaluering af bakterie- og/eller svampedræbende aktivitet af kemiske desinfektionsmidler til brug i fødevarerindustrien, hos forbrugere samt institutioner - Prøvningsmetode og krav (fase 2, trin 2)
- Udtagning:** Rekvirenten
- Periode:** Prøvemodtagelse: 12 juni 2020
Prøvningen er gennemført: 19 juni – 2 juli 2020
- Opbevaring:** Prøvematerialet vil blive destrueret efter 3 måneder, hvis ikke andet er aftalt skriftligt.
- Bemærkning:** Redegørelse for anvendt(e) metode(r) vedrører kun de(t) analyserede emne(r).
- Vilkår:** Prøvningen er udført i henhold til internationale krav (ISO/IEC 17025:2017) og i henhold til Teknologisk Instituts almindelige vilkår. PrøveResultaterne gælder udelukkende for de(t) prøvede emne(r) eller de(n) til analyse udtagne delprøve(r). Analyserapporten må kun gengives i uddrag, hvis Teknologisk Institut skriftligt har godkendt uddraget.
- Dato/sted:** 31. juli 2020
Teknologisk Institut, Aarhus
Kemisk og Mikrobiologisk Laboratorium
- Underskrift:** Helle Stendahl Andersen
Forretningsleder

Indholdsfortegnelse

Analyserapport	1
Introduktion	3
Fremgangsmåde	3
Begrundelse for den valgte testmetode	3
Eksperimentelle forhold	4
Produkt	4
Resultatat	5
Konklusion.....	5
Analysis method.....	5
Bilag 1: <i>P. aeruginosa</i> – BioCid DESINFICERING.....	6
Bilag 2: <i>P. aeruginosa</i> – BioCid DESINFICERING.....	7
Bilag 3: <i>E. coli</i> – BioCid DESINFICERING	8
Bilag 4: <i>E. coli</i> – BioCid DESINFICERING	9
Bilag 5: <i>S. aureus</i> – BioCid DESINFICERING	10
Bilag 6: <i>S. aureus</i> - BioCid DESINFICERING.....	11
Bilag 7: <i>E. hirae</i> - BioCid DESINFICERING	12
Bilag 8: <i>E. hirae</i> - BioCid DESINFICERING	13

Introduktion

Effektiviteten af BioCid DESINFICERING til overfladedesinfektion, når produktet bliver tilført en overflade ved at benytte en elektrostatiske sprayer blev testet i henhold til en modificeret version af DS/EN 13697:2015+A1:2019.

Ved test produktet i overensstemmelse med DS/EN 13697 og under de krævede testbetingelser, skal produktet opnå ≥ 4 reduktion i antallet af cfu for de anvendte bakterier.

Fremgangsmåde

For hver testorganisme blev testsuspensionen blandet med et interfererende stof og overført til en overflade af rustfrit stål og tørret ved 37 ° C indtil synligt tør.

De rustfri ståldisk blev anbragt på et bord. Bordet blev desinficeret med produktet ved hjælp af en håndholdt sprayer, ved at føre den hen over overfladen en enkelt gang.

Produktet blev overført til overfladen således, at en tynd homogen film dækkede bordet og den tørrede bakteriesuspension på skiverne i rustfrit stål. Overfladen blev efterladt i 5 minutter. ved stuetemperatur.

De rustfrit ståldisk blev derefter overført til et neutraliseringsmiddel for at neutralisere effekten af produktet. Antallet af overlevende mikroorganismer blev kvantificeret og sammenlignet med en kontrolprøve, hvor produktet blev erstattet med destilleret vand.

Begrundelse for den valgte testmetode

Da produktet tilføres overfladen ved at sprøjte det manuelt på alle overflader i et rum, blev DS/EN 13697 valgt som egnet testmetode. Ved applikation af produktet skal en $\geq \log_4$ -reduktionen opnås i henhold til DS/EN 13697.

Antallet af disks i rustfrit stål var tre i henhold til DS/EN 17272 for at undersøge, om fordelingen af produkterne på overfladen var homogen ved brug af Victory elektrostatiske sprayer.

Evalueringen af resultater blev også udført i henhold til DS / EN 17272 for at opnå en lavere detektionsgrænse.

På grund af filtreringstrinnet og evaluering af om testorganismene bliver vasket af de rustfrit ståldisks kan der opnås en lavere detektionsgrænse end ved evaluering i henhold til DS/EN 13697. Imidlertid forårsagede filtrering af 87 ml neutraliseringsmiddel tilstopning af filteret, så kun 10 ml filtrater blev anvendt til evaluering af resultaterne.

Eksperimentelle forhold

Testorganismer:	<i>Enterococcus hirae</i> , ATCC 10541 <i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 <i>Escherichia coli</i> , ATCC 10536	
Elektrostatisk sprayer:	'Håndholdt Sprayer' VP200ESK fra Victory Innovations	
Flow rate for elektrostatisk sprayer:	97L/min.	
Kontaktid:	5 min. ± 10 sek.	
Testtemperatur:	Room temperatur (20-25°C)	
Inkubation:	(37 ± 1) °C i 48 timer	
Interfererende substans (simuleret rene forhold):	0.3 g/L bovin albumin	
Neutraliseringsmiddel:	Saponin	30 g/L
	Lecithin	3 g/L
	Polysorbate 80	30 g/L
	Na-thiosulfat	5 g/L
	L-histidin	1 g/L
	Opløst i 0.25 mmol/L fosfat buffer	
Skyllevæske:	Trypton	1g/L
	NaCl	9g/L
	Polysorbate 80	5g/L
Testoverflade:	Rustfri stål overflade (4 cm diameter) Grade 2 B 1.4301 (EN 10088-1). Testoverfladen var rengjort og steriliseret	
Antal rustfri staldisks:	3 pr testorganisme	

Produkt

Produkt	Produktnavn	Cat No.	PR No.	Aktivstof	koncentration	Udseenede
BioCid fra BioGroup	BioCid DESINFICERING	2101	4258691	Didecyldimethylammoniumchloride	0.19 %w/w	Clear liquid
				N-(3-aminopropyl)-N-odecylpropan-1,3-diamin	0.39 % w/w	

Tabel 1: Produkt testet for overfladedesinfektion ved påføring på overfladen ved hjælp af Victory elektrostatisk sprayer.

Resultatat

Produktet skal opnå $\geq \log 4$ reduktion for alle bakterier anvendt til testen.

Testorganisme	BioCid DESINFICERING
<i>P. aeruginosa</i>	$\geq 4,93 \pm 2,18$
<i>E. coli</i>	$\geq 6,76 \pm 0,33$
<i>S. aureus</i>	$5,68 \pm 0,57$
<i>E. hirae</i>	$\geq 5,71 \pm 0,02$

Tabel 2: Log-reduktion \pm standardafvigelse. Log reduktionen er beregnet som $N_c - N_d$ (se bilag 1-8). For at bestå testen, skal produktet opnå $\geq \log 4$ reduktion for alle bakterier anvendt til testen.

Se bilag 1-8 for alle resultater.

Konklusion

BioCid DESINFICERING BioGroup opfylder kravene for bakteriedræbende effekt i henhold til DS/EN 13697: 2015+A1:2019, modificeret version, testet under simulerede rene forhold og ved at anvende Victory sprayer med en flow rate på 97L/min til overfladedesinfektion.

Effektiviteten overfor *P. aeruginosa* varierede i tredobbelbestemmelsen. Se bilag 1.

Analysis method

Testen blev udført efter Teknologisk Instituts metode: 703-02, modificeret version.

Referencemetoder:

Modificeret version af DS/EN 13697:2015 + A1:2019: Kvantitativ non-porøs overfladeprøvning til evaluering af bakterie- og/eller svampedræbende aktivitet af kemiske desinfektionsmidler til brug i fødevareindustrien, hos forbrugere samt institutioner - Prøvningsmetode og krav (fase 2, trin 2)

Modificeret version af DS/EN 17272:2020: Luftbårne automatiserede processer til desinfektion af overflader i rum – Påvisning af antimikrobiel effekt overfor vegetative bakterier, mycobakterier, sporer, skimmelsvampe, gærsvampe, virus og bakteriofager - Prøvningsmetode og krav (fase 2, trin 2).

Bilag 1: *P. aeruginosa* – BioCid DESINFICERING

Produktkoncentration / Kontakttid	BioCid DESINFICERING / 5 min.
--	-------------------------------

Testsuspension N	Fortynding	Tællinger/plade		N [celler/mL] Log(N)	$5 \cdot 10^7 \leq N \leq 5 \cdot 10^9$ $7,7 \leq \log(N) \leq 9,7$	N [celler/metaldisk] Log(N)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	10 ⁻⁷	318	32	3,20·10 ⁹	7,7 ≤ 9,51 ≤ 9,7	8,00·10 ⁷
	10 ⁻⁸	>330	34	9,51	Accepteret	7,90

Kontrolplader	Fortynding	Tællinger/plade T1		T1: [celler/metaldisk] ≥ 1·10⁶ CFU/disk Log(T1)	Tællinger/plade T2		T2: [celler/metaldisk] ≥ 1·10⁶ CFU/disk Log(T2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	10 ⁻²	>330	>330	1,34·10 ⁷	>330	>330	2,20·10 ⁷
	10 ⁻³	124	141	Accepteret	205	237	Accepteret
	10 ⁻⁴	15	15	7,13	26	15	7,34

Test	Fortynding/ filtreringsvolumen	Tællinger/plade, Test 1		Tællinger/plade, Test 2		Tællinger/plade, Test 3		Resultat	n'1+n'2	Log(n'1+n'2)	Log- reduktion T = 7,23
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	10 ⁰	<1	<1	<1	<1	>330	>330	Test 1	<1,10·10 ¹	<1,04	≥6,19
	10 ⁻¹	<1	<1	<1	<1	56	76	Test 2	<1,10·10 ¹	<1,04	≥6,19
	10 ⁻²	<1	<1	<1	<1	4	8	Test 3	6,60·10 ⁴	4,82	2,41
	10 ⁻³	<1	<1	<1	<1	<1	<1				
	10 ml		<1	<1	<1	<1	>165				
n'2: CFU/metaldisk	Disk (n'2)	1		<1		77				Gennemsnit ±std.afv	≥4,93±2,18

Tabel 3: n'1: CFU/membranfilter. N'2: CFU/disk. Nedre grænse 14 CFU/ml. Ved <14 CFU er tallet inkluderet i den endelige beregning som <14. Hvis <14/ml i fortyndinger, benyttes kun resultatet fra filtreringen.

Bilag 2: *P. aeruginosa* – BioCid DESINFICERING

Metodevalidering	BioCid DESINFICERING / 5 min.
Produktkoncentration	

Testsuspension N	Fortynding	Tællinger/plade		N [celler/mL] Log(N)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	10 ⁰	54	63	3,58·10 ⁸
				1,77

Metodevalidering	Fortynding	Tællinger/plade VC		VC₁: celler/mL/Log(VC₁)
Neutraliserings- Fortyndings-metoden	10 ⁰	301	276	288
				2,46

Metodevalidering	Fortynding af testorganisme som blev tilført metaldisken	Tællinger/plade	Metaldisk celler/mL/Log₁₀
Inhiberende effekt af indstøbning af metaldisk i agarosegel	10 ⁰	279	279
			2,45

Resultat

Log₁₀ for Testsuspension	Log₁₀ for VC for Neutraliserings- Fortyndings-metoden	Log₁₀ for testorganisme tilført metaldisken
1,77	2,46	2,45

Tabel 4: Resumé af metodevalideringen ved udførelse af test med *P. aeruginosa*

Bemærkning

Opløsningen benyttet til at vaske metaldiskene havde ikke en signifikant toksisk effekt overfor den benyttede testorganisme.

Indstøbning af disken i agarosegel havde ikke nogen signifikant inhiberende toksisk effekt overfor den benyttede testorganisme.

Bilag 3: *E. coli* – BioCid DESINFICERING

Produktkoncentration / Kontakttid		BioCid DESINFICERING / 5 min.									
Testsuspension N <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	Fortynding	Tællinger/plade		N [celler/mL] Log(N)	$5 \cdot 10^7 \leq N \leq 5 \cdot 10^9$ $7,7 \leq \log(N) \leq 9,7$			N [celler/metaldisk] Log(N)			
	10 ⁻⁷	>330	>330	4,05·10 ⁹	7,7 ≤ 9,61 ≤ 9,7			1,01·10 ⁸			
	10 ⁻⁸	44	37	9,61	Accepteret			8,01			
Kontrolplader <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	Fortynding	Tællinger/plade T1		T1: [celler/metaldisk] ≥ 1·10⁶ CFU/disk Log(T1)		Tællinger/plade T2		T2: [celler/metaldisk] ≥ 1·10⁶ CFU/disk Log(T2)			
	10 ⁻²	>330	>330	9,65·10 ⁷		>330	>330	1,01·10 ⁸			
	10 ⁻³	>330	>330	Accepteret		>330	>330	Accepteret			
	10 ⁻⁴	100	93	7,98		104	98	8,00			
Test <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	Fortynding filtrerings volumen	Tællinger/plade, Test 1		Tællinger/plade, Test 2		Tællinger/plade, Test 3		Resultat	n'1+n'2	Log(n'1+n'2)	Log- reduktion T = 7,99
	10 ⁰	<1	<1	<1	<1	3	3	Test 1	<1,10·10 ¹	<1,04	≥6,95
	10 ⁻¹	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Test 2	<1,10·10 ¹	<1,04	≥6,95
	10 ⁻²	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Test 3	4,10·10 ¹	1,61	6,38
	10 ⁻³	<1	<1	<1	<1	<1	<1				
	10 ml	<1		<1		4				Gennemsnit ±std.afv	≥6,76±0,33
n'2: CFU/metaldisk	Disk (n'2)		<1		1						

Tabel 5 n'1: CFU/membranfilter. N'2: CFU/disk. Nedre grænse 14 CFU/ml. Ved <14 CFU er tallet inkluderet i den endelige beregning som <14. Hvis <14/ml i fortyndinger, benyttes kun resultatet fra filtreringen. Testsuspensionen for *E. coli* var 10x højere da den er følsom overfor indtørring, hvilket forårsager et højere tab af levedygtige bakterier.

Bilag 4: *E. coli* – BioCid DESINFICERING

Metodevalidering	BioCid DESINFICERING / 5 min.
Produktkoncentration	

Testsuspension N	Fortynding	Tællinger/plade		N [celler/mL] Log(N)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	10 ⁰	80	63	75
				1,85

Metodevalidering	Fortynding	Tællinger/plade VC		VC₁: celler/mL/Log(VC₁)
Neutraliserings- Fortyndings-metoden	10 ⁰	72	70	71
				1,85

Metodevalidering	Fortynding af testorganisme som blev tilført metaldisken	Tællinger/plade	Metaldisk celler/mL/Log₁₀
Inhiberende effekt af indstøbning af metaldisk i agarosegel	10 ⁰	62	62
			1,91

Resultat

Log₁₀ for Testsuspension	Log₁₀ for VC for Neutraliserings- Fortyndings-metoden	Log₁₀ for testorganisme tilført metaldisken
1,85	1,85	1,91

Tabel 6: Resumé af metodevalideringen ved udførelse af test med *E. coli*.

Bemærkninger

Opløsningen benyttet til at vaske metaldiskene havde ikke en signifikant toksisk effekt overfor den benyttede testorganisme.

Indstøbning af disken i agarosegel havde ikke nogen signifikant inhiberende toksisk effekt overfor den benyttede testorganisme.

Bilag 5: *S. aureus* – BioCid DESINFICERING

Produktkoncentration / Kontakttid	BioCid DESINFICERING / 5 min.
-----------------------------------	-------------------------------

Testsuspension N	Fortynding	Tællinger/plade		N [celler/mL] Log(N)	$5 \cdot 10^7 \leq N \leq 5 \cdot 10^9$ $7,7 \leq \log(N) \leq 9,7$	N [celler/metaldisk] Log(N)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10 ⁻⁶	>330	>330	4,60·10 ⁸	Accepteret	1,15·10 ⁷
	10 ⁻⁷	51	41	8,66		7,06

Kontrolplader	Fortynding	Tællinger/plade T1		T1: [celler/metaldisk] ≥1·10 ⁶ CFU/disk Log(T1)	Tællinger/plade T2		T2: [celler/metaldisk] ≥1·10 ⁶ CFU/disk Log(T2)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10 ⁻²	>330	>330	4,35·10 ⁷	>330	>330	1,52·10 ⁷
	10 ⁻³	>330	>330	Accepteret	149	139	Accepteret
	10 ⁻⁴	48	39	7,64	22	25	7,18

Test	Fortynding filtrerings volumen	Tællinger/plade, Test 1		Tællinger/plade, Test 2		Tællinger/plade, Test 3		Resultat	n'1+n'2	Log(n'1+n'2)	Log- reduktion T = 7,41
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10 ⁰	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Test 1	1,71·10 ²	2,23	5,18
	10 ⁻¹	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Test 2	7,10·10 ¹	1,85	5,56
	10 ⁻²	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Test 3	1,30·10 ¹	1,11	6,30
	10 ⁻³	<1	<1	<1	<1	<1	<1				
	10 ml		17		7		1				
n'2: CFU/metaldisk	Disk (n'2)		<1		<1		3			Gennemsnit ±std.afv	5,68±0,57

Tabel 7: n'1: CFU/membranfilter. N'2: CFU/disk. Nedre grænse 14 CFU/ml. Ved <14 CFU er tallet inkluderet i den endelige beregning som <14. Hvis <14/ml i fortyndinger, benyttes kun resultatet fra filtreringen.

Bilag 6: *S. aureus* - BioCid DESINFICERING

Metodevalidering	BioCid DESINFICERING /
Produktkoncentration	5 min.

Testsuspension N	Fortynding	Tællinger/plade		N [celler/mL] Log(N)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10 ⁰	94	92	93
				1,97

Metodevalidering	Fortynding	Tællinger/plade VC		VC₁: celler/mL/Log(VC₁)
Neutraliserings- Fortyndings-metoden	10 ⁰	336	357	346
				2,54

Metodevalidering	Fortynding af testorganisme som blev tilført metaldisken	Tællinger/plade	Metaldisk celler/mL/Log₁₀
Inhiberende effekt af indstøbning af metaldisk i agarosegel	10 ⁻⁷	261	261
			2,42

Resultat

Log₁₀ for Testsuspension	Log₁₀ for VC for Neutraliserings- Fortyndings-metoden	Log₁₀ for testorganisme tilført metaldisken
1,97	2,54	2,42

Tabel 8: Resumé af metodevalideringen ved udførelse af test med *S. aureus*.

Bemærkninger

Opløsningen benyttet til at vaske metaldiskene havde ikke en signifikant toksisk effekt overfor den benyttede testorganisme.

Indstøbning af disken i agarosegel havde ikke nogen signifikant inhiberende toksisk effekt overfor den benyttede testorganisme.

Bilag 7: *E. hirae* - BioCid DESINFICERING

Produktkoncentration / Kontakttid	BioCid DESINFICERING / 5 min.
--	-------------------------------

Testsuspension N	Fortynding	Tællinger/plade		N [celler/mL] Log(N)	$5 \cdot 10^7 \leq N \leq 5 \cdot 10^9$ $7,7 \leq \log(N) \leq 9,7$	N [celler/metaldisk] Log(N)
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	10 ⁻⁶	>330	>330	3,60·10 ⁸	7,7 ≤ 8,56 ≤ 9,7	2,30·10 ⁷
	10 ⁻⁷	37	35	8,56	Accepteret	7,36

Kontrolplader	Fortynding	Tællinger/plade T1		T1: [celler/metaldisk] ≥ 1·10⁶ CFU/disk Log(T1)	Tællinger/plade T2		T2: [celler/metaldisk] ≥ 1·10⁶ CFU/disk Log(T2)
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	10 ⁻²	>330	>330	4,86·10 ⁶	>330	>330	6,35·10 ⁶
	10 ⁻³	51	56	Accepteret	67	60	Accepteret
	10 ⁻⁴	4	5	6,69	1	<1	6,80

Test	Fortynding filtrerings volumen	Tællinger/plade, Test 1		Tællinger/plade, Test 2		Tællinger/plade, Test 3		Resultat	n'1+n'2	Log(n'1+n'2)	Log- reduktion T = 6,77
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	10 ⁰	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Test 1	<1,10·10 ¹	<1,04	≥5,72
	10 ⁻¹	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Test 2	<1,10·10 ¹	<1,04	≥5,72
	10 ⁻²	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Test 3	<1,10·10 ¹	<1,08	≥5,69
	10 ⁻³	<1	<1	<1	<1	<1	<1				
	10 ml		<1		<1		1				
n'2: CFU/metaldisk	Disk (n'2)		<1		<1		2			Gennemsnit ±std.afv	≥5,71±0,02

Tabel 9: n'1: CFU/membranfilter. N'2: CFU/disk. Nedre grænse 14 CFU/ml. Ved <14 CFU er tallet inkluderet i den endelige beregning som <14. Hvis <14/ml i fortyndinger, benyttes kun resultatet fra filtreringen.

Bilag 8: *E. hirae* - BioCid DESINFICERING

Metodevalidering	BioCid DESINFICERING / 5 min.
Produktkoncentration	

Testsuspension N	Fortynding	Tællinger/plade		N [celler/mL] Log(N)
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	10 ⁰	77	70	74
				1,87

Metodevalidering	Fortynding	Tællinger/plade VC		VC₁: celler/mL/Log(VC₁)
Neutraliserings- Fortyndings-metoden	10 ⁰	77	68	73
				1,83

Metodevalidering	Fortynding af testorganisme som blev tilført metaldisken	Tællinger/plade	Metaldisk celler/mL/Log₁₀
Inhiberende effekt af indstøbning af metaldisk i agarosegel	10 ⁰	55	58
			1,76

Resultat

Log₁₀ for Testsuspension	Log₁₀ for VC for Neutraliserings- Fortyndings-metoden	Log₁₀ for testorganisme tilført metaldisken
1,87	1,83	1,76

Tabel 10: Resumé af metodevalideringen ved udførelse af test med *E. hirae*.

Bemærkninger

Opløsningen benyttet til at vaske metaldiskene havde ikke en signifikant toksisk effekt overfor den benyttede testorganisme.

Indstøbning af disken i agarosegel havde ikke nogen signifikant inhiberende toksisk effekt overfor den benyttede testorganisme.