

Laboratoires J. Simon n.v.
Accredited Laboratory for the Analysis of
Medicines, Dietary Products, Cosmetics and Foods

To: Bayer
Stationplein 61
3800 Sint-Truiden
For the attention of Mr. J. Van Diest

Our ref.: 88.015483/2/SJ.FB

29th September 1988

ANALYTICAL REPORT

Re.: VIRKON-S

Determination of sporicidal and fungicidal efficacy by the 5-5-5 test.

Purpose of the test

The purpose of the test is to verify the sporicidal and fungicidal efficacy of a product in an reliable in vitro laboratory test. This laboratory evaluation gives no insight into the efficacy of the product under practical conditions.

Principle

Suspensions of microorganisms are taken up in a solution of the product at its concentration of use. The fraction of surviving organisms is determined after 5 minutes of action at room temperature.

Test organisms

Suspensions of Bacillus cereus ATCC 9634 spores and Clostridium sporogenes ATCC 19404 spores are used to measure the sporicidal efficacy of the product. A suspension of Candida albicans ATCC 10231 is used to test the fungicidal action of the product.

Cultivation of the test strains

Bacillus cereus was grown for 24 hours at 32±2°C on tryptone-soya agar in Petri dishes. A subculture was then prepared in tryptone-soya broth at 32±2°C for 48 hours. This suspension was heated in a water-bath at 80°C for one minute to obtain a spore suspension. This suspension was counted by dilution in Petri dishes.

Clostridium sporogenes was cultivated anaerobically for 24 hours at $32 \pm 2^\circ\text{C}$ on tryptone-soya agar in Petri dishes. A subculture was then prepared in tryptone-soya broth at $32 \pm 2^\circ\text{C}$ for 48 hours. In order to obtain a spore suspension, this culture was heated in a water bath at 65°C for one minute. This suspension was counted by dilution in Petri dishes.

Candida albicans was cultivated for 24 hours at $32 \pm 2^\circ\text{C}$ on malt extract agar in Petri dishes. A subculture was prepared in malt extract broth for 48 hours. This suspension was counted by dilution in Petri dishes.

The test

The product VIRKON-S was tested at a concentration of 1% (v/v). It was diluted with 0.9% saline. Three 100-ml Erlenmeyer flasks were filled with 24 ml of the test solution and 3 others were filled with 24 ml of 0.9% saline. All flasks were placed in a water bath at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Similar amounts of bacterial suspension (see above) and bovine serum albumin solution were mixed in other flasks for each test strain. After mixing, 1 ml of each of these preparations was transferred to a flask with disinfectant and a flask without disinfectant. After 5 minutes of action, 1 ml of liquid was taken from each flask and pipetted into a Petri dish with 9 ml of inactivation solution at a temperature of $20 \pm 1^\circ\text{C}$, and mixed well. After 5 minutes, enough of the contents was taken so that, after dilution with physiological saline, 1 ml produced not more than 200 and, if possible, not less than 20 colonies. These dilutions were plated out on at least 3 Petri dishes.

The cultivation medium was tryptone-soya agar in the case of *Bacillus cereus* and *Clostridium sporogenes*, and malt extract agar for *Candida albicans*. The plates were incubated for 48 hours at $32 \pm 2^\circ\text{C}$ (under anaerobic conditions for *Clostridium sporogenes*).

Verification

The following test was performed to verify the absence of effective residual concentrations of disinfectant. The test was performed as described above but with physiological saline instead of disinfectant. After 5 minutes of action, 1 ml of liquid was pipetted from each flask into a Petri dish with 9 ml of inactivating medium, after which 1 ml of the tested concentration of disinfectant in physiological saline was added.

The number of colonies on plates for counting any still effective residual concentration of disinfectant may not be more than a factor of 2 less than the number of colonies on identical plates counted without the action of the product.

Results

	Microbial count of the suspension	Test with physiological saline	Test with disinfectant	Verification
Candida albicans	7.7 x 10 ⁷ /ml	7.3 x 10 ⁷ /ml	0	6.5 x 10 ⁷ /ml
Bacillus cereus	1.67x 10 ⁶ /ml	6.0 x 10 ⁵ /ml	0	1.08 x 10 ⁶ /ml
Clostridium sporogenes	6.05x 10 ⁶ /ml	2.9 x 10 ⁷ /ml	0	2.78 x 10 ⁷ /ml

The microbicidal effect after 5 minutes of action at 20°C was calculated according to the following formula:

$$\frac{ME}{5}^{20} = \log N_c - \log N_d$$

where: N_c = number of colony-forming units per ml of liquid after action of the test product

N_d = number of colony-forming units per ml of liquid without action of the test product

$$\frac{ME}{5}^{20} \text{ must be at least } 5.$$

CONCLUSION

According to the 5-5-5 test, the product VIRKON-S at a concentration of 1% (v/v) is active against Candida albicans ATCC 10231, spores of Bacillus cereus ATCC 9634 and spores of Clostridium sporogenes ATCC 19404 after 5 minutes of contact at room temperature.

J. Scouvert
Pharmacist



s.a. Laboratoires J. Simon n.v.

Laboratoires agréés
pour l'analyse des médicaments,
des produits diététiques,
cosmétiques et alimentaires

Erkende laboratoria
voor de analyse van
geneesmiddelen, diëtische producten,
cosmetica en voedingswaren

Nos réf

88.015483.2/SJ.FB.

BAYER

Stationplein, 61

3800 SINT - TRUIDEN
t.a.v. de Heer J. Van Dieet

Bierges, le 29 september 1988

ANALYSE VERSLAG

Betreft : VIRKON - 5.

Bepaling van de sporicide en fungicide werkzaamheid door
de 5 - 5 - 5 test.

Doel van het onderzoek :

*Het doel van het onderzoek is om, door een in vitro eenvoudige
laboratorium proef, de sporicide en fungicide werkzaamheid van
een produkt te verifiëren.*

*Deze laboratorium evaluatie geeft geen oordeel over de
effectiviteit van de preparaat onder praktijkomstandigheden.*

Principe :

Suspensies van microorganismen worden aan een oplossing met de
gebruikelijke concentratie van het produkt toegevoegd.
Na 5 minuten inwerkingstijd bij kamertemperatuur wordt de fractie
overlevende organismen bepaald.

Toetorganismen :

Om de sporicide werkzaamheid van het produkt te bepalen werden
suspensies van sporen van *Bacillus cereus* ATCC 9634 en van
Clostridium sporogenes ATCC 19404 gebruikt.

Om de fungicide werking van het produkt te testen werd een
suspensie *Candida albicans* ATCC 10231 gebruikt.

1.
CJ.

Kweken van de toetsstammen:

Bacillus cereus wordt gedurende 24 U in Petri schalen met Tryptone-soja agar bij 32 +/- 2°C gekweekt.

Een subcultuur wordt dan gemaakt in Tryptone soja bouillon bij 32 +/- 2°C. gedurende 48 U.

Deze suspensie wordt in een waterbad tot 80°C gedurende 1 minuut opgewarmd om een sporensuspensie te verkrijgen.

Het kiemgetal van deze suspensie wordt door verdunningen in Petri schalen bepaald.

Clostridium sporogenes wordt gedurende 24 U. in Petri schalen met Tryptone-soja agar in anaerobiose bij 32 +/- 2°C. gekweekt.

Een subcultuur wordt dan gemaakt in Tryptone-soja bouillon bij 32 +/- 2°C. gedurende 48 U.

Om een sporensuspensie te verkrijgen is deze cultuur gedurende 1 minuut bij 65°C. in een waterbad opgewarmd.

Het kiemgetal van deze suspensie wordt door verdunningen in Petri schalen bepaald.

Candida albicans wordt gedurende 24 U in Petri schalen met Malt Extract agar bij 32 +/- 2°C. gekweekt.

Een subcultuur wordt gedurende 48 U in Malt Extract bouillon gemaakt.

Het kiemgetal van deze suspensie wordt door verdunningen in Petri schalen bepaald.

Proef :

Het produkt VIRKON-S wordt bij een concentratie van 1 % (v/v) getest. Het wordt met een 0,9 % natrium chloride oplossing verdund.

3 100 ml- erlenmeyer kolfjes worden met 24 ml van de te testen oplossing gevuld. 3 andere kolfjes werden met 24 ml 0,9 % NaCl oplossing gevuld.

Alle kolfjes worden in een schudwaterbad van 20 +/- 1°C geplaatst. Voor elk toetsstam brengt men in een kolfje gelijke hoeveelheden bacterie suspensie (zie hierboven) en bovine albumine oplossing. Na het mengen van deze preparaat wordt 1 ml ervan aan een kolfje met desinfectans zowel als aan een kolfje zonder desinfectans toegevoegd.

Na een inwerkingstijd van 5 minuten wordt uit elk kolfje 1 ml vloeistof geplipetteerd in een cultuurbuisje met 9 ml inactiverings-vloeistof met een temperatuur van 20° +/- 1°C en hiermee goed gemengd.

Na 5 minuten worden uit de inhoud zonodig, dus - danige verdunningen bereid met fysiologische zoutoplossing dat per 1 ml niet meer dan 200 en zo mogelijk niet minder dan 20 kolonies worden verkregen.

Met deze verdunningen werden tenminste 3 Petri schalen per verdunning bereid.

Voor *Bacillus cereus* en *Clostridium sporogenes* wordt gebruik gemaakt van Tryptone-soja agar als voedingsbodem.
 Voor *Candida albicans* gebruikt men Malt extract agar.
 De platen worden 48 U bij 32 +/- 2°C. (in anaerobiose voor *Clostridium sporogenes*) bebroed.

Verificatie:

Ter verificatie van de afwezigheid van nog werkzame restconcentraties desinfectans wordt de navolgende test uitgevoerd. De test is uitgevoerd zoals hierboven beschreven maar met fysiologische oplossing in plaats van desinfectans. Na een inwerkingstijd van 5 minuten wordt uit elk kolfje 1 ml vloeistof wordt gepipetteerd in een cultuurbuisje met 9 ml inactiveringsvloeistof waaraan onmiddellijk voordien 1 ml van de onderzochte concentratie van het desinfectans in fysiologische oplossing is toegevoegd. Het aantal kolonies op de telplaten van de bepaling van nog werkzame restconcentraties desinfectans mag niet meer aan een factor 2 kleiner zijn dan het aantal kolonies op overeenkomstige telplaten van de waarde bepaling zonder inwerking van het preparaat.

Resultaten:

	Kiemgetal van de suspensie	Proef met fysiolog. oplossing	Proef met desinfectans	Verificatie
<i>Candida albicans</i>	$7,7 \cdot 10^7 / \text{ml}$	$7,3 \cdot 10^7 / \text{ml}$	0	$6,5 \cdot 10^7 / \text{ml}$
<i>Bacillus cereus</i>	$1,67 \cdot 10^6 / \text{ml}$	$6,0 \cdot 10^5 / \text{ml}$	0	$1,08 \cdot 10^6 / \text{ml}$
<i>Clostridium sporogenes</i>	$6,05 \cdot 10^6 / \text{ml}$	$2,9 \cdot 10^7 / \text{ml}$	0	$2,78 \cdot 10^7 / \text{ml}$

Het kiemdodend effect na 5 minuten inwerking bij 20°C. wordt volgens de volgende formula berekend :

$$ME = \frac{20}{5} = \text{Log } N_c - \text{log } N_d$$

waar N_c = aantal kolonievormende eenheden per ml van vloeistof zonder inwerking van het preparaat.

N_d = aantal kolonievormende eenheden per ml van de vloeistof na inwerking van het preparaat.

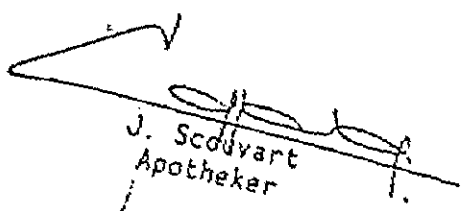
h

88.15483/2/SJ.FB.

ME²⁰₅ moet tenminste 5 bedragen.

BESLUIT

Het produkt VIRKON-S is actief bij een 1 % concentratie (V/V) tegen *Candida albicans* ATCC 10231, sporen van *Bacillus cereus* ATCC 9634 en van *Clostridium sporogenes* ATCC 19404 in 5 minuten contact bij kamertemperatuur volgens de 5 - 5 - 5 test.


J. Schuyart
Apotheker