



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

EVALUATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE D'UNE PEINTURE ANTIBACTERIENNE SELON LA NORME ISO 22196 : 2007

Rapport rédigé par : Dr Marlène RICHARD

Marseille: le 19 juillet 2011

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

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 520 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

TABLE DES MATIERES

| | | |
|--------|--|----|
| I : | DESCRIPTION DE L'ÉTUDE : | 3 |
| II : | OBJECTIF DE L'ÉTUDE : | 3 |
| III : | MATÉRIEL : | 3 |
| | a) Surfaces antimicrobiennes : | 3 |
| | b) Souches microbiennes : | 4 |
| | c) Milieu d'entretien et de dénombrement : | 4 |
| | d) Solution de récupération : | 4 |
| | e) Diluant : | 5 |
| IV : | MÉTHODE : | 6 |
| | a) Suspension d'essai : | 6 |
| | b) Contamination des surfaces à tester : | 6 |
| | c) Incubation des surfaces contaminées : | 7 |
| | d) Détermination du niveau de contamination des surfaces tests : | 7 |
| | e) Conditions d'essai : | 7 |
| | f) Expression de l'activité antimicrobienne : | 8 |
| V : | RÉSULTATS : | 8 |
| | a) Validation des conditions d'essai : | 8 |
| | b) Essais proprement dits : | 9 |
| VI : | CONCLUSIONS : | 10 |
| VII : | RÉFÉRENCES : | 10 |
| VIII : | BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE : | 10 |

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

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 520 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

H Y G I E N E - F O R M A T I O N - E V A L U A T I O N
R E C H E R C H E & D E V E L O P P E M E N T

I : DESCRIPTION DE L'ETUDE:

| | |
|------------------------------|---|
| Intitulé: | Evaluation de l'activité bactéricide d'une peinture antibactérienne selon la norme ISO 22196 : 2007 |
| Référence interne: | Etude n° 1061.LEG.11 |
| Commanditaire : | LEGRAND 128, av. du Maréchal de Lattre de Tassigny 87045 Limoges Cedex <i>Contact:</i> Mr PASSERIEUX |
| Période d'essai: | Du 27/06/2011 au 29/06/2011 |
| Responsable étude : | Dr Marlène RICHARD |
| Essais réalisés par : | Audrey BANCOD |
| Laboratoire d'essai : | Laboratoire BIOTECH-GERMANDE Parc Scientifique de Luminy 163 Avenue de Luminy – Case 927 13288 Marseille Cedex 9 |

II : OBJECTIF DE L'ETUDE :

Déterminer selon les conditions expérimentales décrites dans la norme ISO 22196 : 2007⁽¹⁾, la capacité d'une peinture antimicrobienne à réduire en 24 heures à 35±1°C le nombre de microorganismes viables déposés sur la surface test.

III : MATERIEL :

a) Surfaces antimicrobiennes :

3 surfaces (50 x 50 x 2 mm) recouvertes d'une peinture antimicrobienne « PLASTICO » et 6 surfaces recouvertes d'une peinture sans agent antimicrobien sont utilisées pour évaluer l'activité bactéricide de cette peinture vis-à-vis de chaque souche microbienne.

- i) *Surfaces :*
Fournisseur :LEGRAND
Référence :Non communiqué
- ii) *Peinture :*
Fournisseur :AKZO NOBEL
Référence :AQUA-LITE LIGHT TECH
Code :8.334.0605
N° de lot :Non communiqué

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

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 520 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

H Y G I E N E - F O R M A T I O N - E V A L U A T I O N
R E C H E R C H E & D E V E L O P P E M E N T

b) Souches microbiennes :

Escherichia coli CIP 53.126
Staphylococcus aureus CIP 53.156

Les conditions de conservation et de contrôle des souches utilisées pour la détermination de l'activité bactéricide sont celles décrites dans la norme Française NF EN 12353 ⁽²⁾.

c) Milieu d'entretien :

Extrait de viande :5,0 g
Peptone :10,0 g
Chlorure de sodium :5,0 g
Agar :15,0 g
Eau distillée:q.s.p. 1000 ml
pH ajusté à une valeur comprise en 7,0 et 7,2 à 25°C.
Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes).

d) Bouillon nutritif (1/500 NB) :

Extrait de viande :3,0 g
Peptone :10,0 g
Chlorure de sodium :5,0 g
Eau distillée:q.s.p. 1000 ml

Bouillon nutritif dilué au 1/500^{ème} dans l'eau distillée.
pH ajusté à une valeur comprise en 6,8 et 7,2 à 25°C.
Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes).

e) Milieu de dénombrement :

Extrait de levures :2,5 g
Tryptone :5,0 g
Glucose :1,0 g
Agar :15,0 g
Eau distillée:q.s.p. 1000 ml
pH ajusté à une valeur comprise en 7,0 et 7,2 à 25°C.
Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes).

f) Solution de récupération :

Peptone de caséine :17,0 g
Peptone de soja :3,0g
Chlorure de sodium :5,0 g
Phosphate hydrogéné disodique :2,5g
Glucose :2,5 g
Lécithine :1,0 g
Eau distillée:q.s.p. 1000 ml
pH ajusté à une valeur comprise en 7,0 et 7,2 à 25°C.
Stérilisé à l'autoclave (121°C, 21 minutes).

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

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 520 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

H Y G I E N E - F O R M A T I O N - E V A L U A T I O N
R E C H E R C H E & D E V E L O P P E M E N T

g) Diluant :

i) Solution stock

Tampon phosphate, pH 7.0 :

Phosphate de potassium monobasique, KH_2PO_4 :34,0 g

Eau distillée:q.s.p. 500 ml

pH ajusté à une valeur comprise en 6.8 et 7,2 à 25°C.

Eau distillée:q.s.p. 1000 ml

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

ii) Solution de travail

Tampon phosphate salin :

Tampon phosphate pH 7.0) :1,25 ml

Chlorure de sodium 0,85% (p/v) :qsp 1000 ml

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

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 520 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

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

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



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

IV : METHODE :

a) Suspension d'essai :

Pour chaque microorganisme, la suspension d'essai du microorganisme test est préparée dans le bouillon nutritif 1/500 NB (cf. III.d). La suspension d'essai du microorganisme test est ajustée de façon à obtenir entre $2,5.10^5$ et 10.10^5 UFC/ml, conformément aux recommandations de la norme ISO 22196 : 2007⁽¹⁾. Le titre exact de chaque suspension d'essai (T_c) est vérifié à chaque essai par une méthode validée et spécifique à chaque microorganisme.

b) Contamination des surfaces à tester :

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

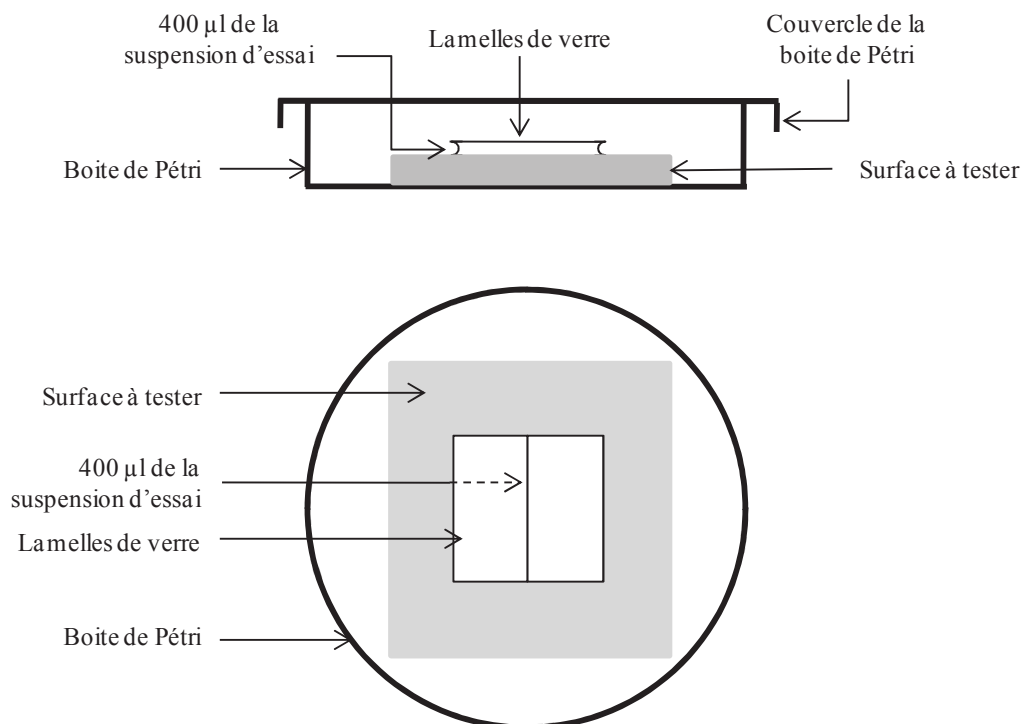


Figure 1 : Contamination de la surface test par la suspension d'essai recouverte de lamelles en verre

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

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 520 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

H Y G I E N E - F O R M A T I O N - E V A L U A T I O N
R E C H E R C H E & D E V E L O P P E M E N T

c) Incubation des surfaces contaminées :

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

d) Détermination du niveau de contamination des surfaces tests :

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

e) Conditions d'essai :

Conformément aux exigences de la norme ISO 22196 : 2007⁽¹⁾, les essais sont jugés satisfaisants si les conditions d'essai suivantes sont remplies :

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

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

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

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

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

- ii) Le nombre moyen de microorganismes viables immédiatement présents après la contamination des surfaces test sans peinture antibactérienne doit être compris entre $6,2 \cdot 10^3$ UFC/cm² et $2,5 \cdot 10^4$ UFC/cm².
- iii) Le nombre de microorganismes viables sur chacune des surfaces sans agent antimicrobien incubées 24 heures ne doit pas être inférieur à $6,2 \cdot 10^1$ UFC/cm².

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

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 520 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B

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

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



BIOTECH - GERMANDE

HYGIENE - FORMATION - EVALUATION
RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

f) Expression de l'activité antimicrobienne :

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

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t$$

- Avec
- R : La valeur de l'activité bactéricide ou facteur de réduction ;
 - U_0 : Logarithme du nombre moyen de microorganismes viables, en UFC/cm², immédiatement après contamination des surfaces sans peinture antibactérienne ;
 - U_t : Logarithme du nombre moyen de microorganismes viables, en UFC/cm², après 24 heures d'incubation sur les surfaces sans peinture antibactérienne ;
 - A_t : Logarithme du nombre moyen de microorganismes viables, en UFC/cm², après 24 heures d'incubation sur les surfaces recouverte d'une monocouche de peinture antibactérienne.

V : RESULTATS :

a) Validation des conditions d'essai :

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

| | Essai 1 (L_{\max}) | Essai 2 (L_{\min}) | Essai 3 | L_{moyen} | $(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{moyen}})$ |
|--|---------------------------|---------------------------|---------|--------------------|--|
| <i>Escherichia coli</i> CIP 53.126 | 5,48 | 5,30 | 5,35 | 5,38 | 0,032 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.156 | 5,15 | 5,14 | 5,14 | 5,14 | 0,003 |

Pour chaque microorganisme test :

- ✓ $(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{moyen}})$ est inférieur à 0,2 (tableau I) ;
 - ✓ Le nombre moyen de microorganismes viables immédiatement présents après la contamination des surfaces test sans agent antimicrobien est bien compris entre $6,2 \cdot 10^3$ UFC/cm² et $2,5 \cdot 10^4$ UFC/cm² pour les deux souches test (cf : tableau II).
 - ✓ Le nombre de microorganismes viables sur chacune des surfaces sans agent antimicrobien incubées 24 heures est supérieur à $6,2 \cdot 10^1$ UFC/cm² pour les deux souches test (cf : tableau II).
- Les conditions d'essais sont donc considérées comme valides pour ces microorganismes.

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

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 520 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

**BIOTECH - GERMANDE****H Y G I E N E - F O R M A T I O N - E V A L U A T I O N**
R E C H E R C H E & D E V E L O P P E M E N T**b) Essais proprement dits :**

Tableau II : Evaluation de l'activité antimicrobienne des surfaces recouvertes d'une peinture antibactérienne vis-à-vis de chaque microorganisme test pour un temps de contact de 24 ± 1 heures à $35 \pm 1^\circ\text{C}$. U_0 : nombre moyen de microorganismes viables par cm^2 de la surface test immédiatement après contamination des surfaces sans agent antimicrobien ; U_t : nombre moyen de microorganismes viables par cm^2 de la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces sans agent antimicrobien ; A_t : nombre moyen de microorganismes viables par cm^2 de la surface test après 24 heures d'incubation sur les surfaces avec agent antimicrobien ; R : activité antimicrobienne.

| | U₀ [Log ₁₀ (Nb. UFC/cm ²)] | U_t [Log ₁₀ (Nb. UFC/cm ²)] | A_t [Log ₁₀ (Nb. UFC/cm ²)] | R [U _t - A _t] |
|--|---|---|---|--|
| <i>Escherichia coli</i> CIP 53.126 | 4,1 | 2,4 | < 1 | > 2,4 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.156 | 3,9 | 3,5 | 2,3 | 1,2 |

D'après les résultats des essais présentés dans le tableau II, l'activité antimicrobienne de la surface recouverte d'une peinture antimicrobienne « PLASTICO » entraîne une réduction de 1,2 log₁₀ lorsque le microorganisme test est *Staphylococcus aureus* CIP 53.156 et une réduction supérieure à 2,4 log₁₀ lorsque le microorganisme test est *Escherichia coli* CIP 53.126.

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

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 520 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr



BIOTECH - GERMANDE

H Y G I E N E - F O R M A T I O N - E V A L U A T I O N
R E C H E R C H E & D E V E L O P P E M E N T

VI : CONCLUSIONS :

Lorsque les essais sont réalisés conformément à la norme ISO 22196 : 2007, l'activité antimicrobienne de la surface recouverte d'une peinture antimicrobienne « PLASTICO » (cf : III) induit, en 24±1 heures de contact à 35±1°C, une réduction de 1.2 log₁₀ lorsque le microorganisme test est *Staphylococcus aureus* CIP 53.156 et une réduction supérieure à 2,4 log₁₀ lorsque le microorganisme test est *Escherichia coli* CIP 53.126

VII : REFERENCES :

1. ISO 22196: 2007 – Measurement of antibacterial activity on plastics surfaces.
2. NF EN 12353: 2006 – Conservation des souches microbiennes utilisées pour la détermination de l'activité bactéricide, mycobactéricide, sporicide et fongicide.

VIII : BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE:

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

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

Les données originales de ce rapport, les cahiers de manipulation, les protocoles et le rapport d'étude final sont stockés dans les archives de Biotech-Germande sous la référence "1061.LEG.11".

Christine AH-DIP
Responsable Assurance Qualité

Signature

Date 19/07/2011

Marlène RICHARD
Directrice adjointe du laboratoire

Signature

Date 19/07/2011

Lionel PINEAU
Directeur Général et Scientifique

Signature

Date 19/07/2011

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

BIOTECH-GERMANDE

SAS au capital de 520 000 Euros N° SIRET : 423 865 419 00026 R.C.S Marseille APE : 7120B
Parc Scientifique de Luminy – 163 Avenue de Luminy – case 927 - 13288 MARSEILLE cedex 9
Tel : 33(0)4 91 82 82 40 Fax : 33(0)4 91 82 82 49 Email : biotech.germande@wanadoo.fr

| Référence | peinture |
|-----------|----------|
| 78329 | X |
| 78330 | X |
| 78332 | X |
| 78335 | X |
| 78336 | X |