# NORME UNE-EN 13697:2015 + A1:2020– activité bactéricide

# NORME UNE-EN 13697:2015 + A1:2020 – activité fongicide

# NORME UNE-EN 14476:2019 + A2– activité virucide

**Équipement: AVATAR by Ecofrog**



# Objectif

Ces essais sont menés à bien pour **évaluer et prouver l'activité bactéricide, fongicide et virucide de l'eau ozonisée** générée sur place par l'équipement qui est étudié conformément aux suivantes normes:

- La norme UNE-EN 13697:2015 + A1:2020 - Essai quantitatif de surface non poreuse pour l'évaluation de l'activité bactéricide et/ou fongicide des désinfectants chimiques utilisés dans des produits alimentaires, dans l'industrie, dans les foyers et dans la collectivité.
- La norme UNE-EN 14476:2019 + A2 - Essai quantitatif de suspension virucide des antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine

L'équipement étudié a été le modèl **AVATAR by Ecofrog** (N° de serie: W04-20/06/0002846) fourni par l'entreprise **Servipro 2.0. S.L.**

## ESSAI ACTIVITÉ BACTÉRICIDE et FONGICIDE
## Norme UNE-EN 13697:2015 + A1:2020

**Réalisation de l'essai: 04/07/2022 – 21/07/2022**
**Rapport analytique: 84521/22 et 82897/22**

# Méthodologie

La méthode stipulée dans ladite norme pour évaluer l'activité bactéricide et fongicide de l'eau ozonisée sur les surfaces est fondée sur la détermination des microorganismes survivant à l'action de cette dernière après l'avoir appliqué sur une surface contaminée préalablement.

Pour ce faire, une solution est préparée avec des bactéries et des champignons de pair avec des substances qui interfèrent et qui doit être appliquée sur une surface en acier inoxydable formant un film qui sèchera postérieurement.

Il est appliqué ensuite l'eau ozonisée qui fait l'objet d'étude dans plusieurs concentrations de sorte à recouvrir le film sec en maintenant une température spécifique et pendant une période de temps définie. L'essai est réalisé dans les concentrations suivantes : 100 %, 95 % et 90 %.

L'étape suivante consiste à transférer la surface à un moyen de neutralisation préalablement validé de sorte à ce que l'action désinfectante de l'eau ozonisée soit neutralisée immédiatement. Il est déterminé ainsi quantitativement le nombre de microorganismes survivants qui peuvent être récupérés de la surface.

Parallèlement, il est déterminé de même le nombre de bactéries et de champignons sur une surface traitée avec de l'eau dure (300mg/Kg CaCo3) au lieu de l'eau ozonisée. La réduction des décomptes viables accordés au produit est calculée par différence.

La substance qui interfère utilisée est une solution aqueuse d'albumine bovine (3g/L) qui simulerait la saleté pouvant exister sur une surface apparemment propre que l'on voudrait désinfecter.

Les neutralisateurs employés ont été la Lécithine (3g/l) ; Tween 80 (30ml/l) ; Tiosulfate sodique (5g/l); L-histidine (1 g/l) ; En tampon phosphate 0,0025N.

Les souches bactériennes et fongiques utilisées ont été :

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15 442
- *Escherichia coli* ATCC 10 536
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6 538
- *Enterococcus hirae* ATCC 10 541
- *Candida albicans* ATCC 10 231
- *Aspergillus niger* ATCC 16 404

L'essai a été réalisé à une température comprise entre 18°C ± l°C et 25°C ± l°C.

Les temps de contact dans le cas des souches bactériennes ont été de 5 minutes ± 10 secondes et les températures d'incubation 37°C ± 1°C.

Dans le cas des souches fongiques, les temps de contact ont été 15 minutes ± 10 secondes et les températures d'incubation 30°C ± 1°C.

# Résultat et conclusion

Dans les tableaux suivants, il est indiqué les **résultats** de l'essai:

| Microorganisme | Suspension fongicide | Essai validation | | Contrôle eau Nc | Procédé d'essai à la concentration % | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | NT | NC | | 1 | 3 | 4 |
| Candida albicans ATCC 10 231 | (10-5) 255,25<br>(10-6) 26,22<br>N:5,76 | (10-3) 117,12<br>(10-4) 12,12<br><br>NT:6,05 | (10-3) 100,10<br>(10-4) 12,10<br><br>NT: 5,86 | 10-3 88,87<br>10-4 7, 6<br>10-5 0, 0<br>Nc: 5,93<br>Nts: >100 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 5,83 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 5,83 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 5,83 |
| Aspergillus niger ATCC 16 404 | (10-5) 255,25<br>(10-6) 24,20<br>N:5,8 | (10-3) 117,12<br>(10-4) 12,12<br><br>NT:6,08 | (10-3) 100,10<br>(10-4) 9,13<br><br>NT:6,01 | 10-3 86, 84<br>10-4 8, 8<br>10-5 0, 0<br>Nc: 5,93<br>Nts: >100 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 5,83 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 5,83 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 5,83 |

| Microorganisme | Suspension bactérienne | Essai validation | | Contrôle eau Nc | Procédé d'essai à la concentration % | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | NT | NC | | 1 | 3 | 4 |
| Pseudomonas aeruginosa ATCC 15 442 | (10-6 ) 236,23<br>(10-7) 23,19<br>N:6,77 | (10-3) 102,10<br>(10-4) 10,14<br>10-5 0, 0<br>NT:6,01 | (10-3) 113,11<br>(10-4) 10,11<br>10-5 0, 0<br>NT:6,05 | 10-3 >300, >300<br>10-4 135, 122<br>10-5 13, 13<br>Nc: 7,11<br>Nts: >100 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 7,01 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 7,01 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 7,01 |
| Escherichia coli ATCC 10 536 | (10-6 ) 219,22<br>(10-7) 21,21<br>N:6,74 | (10-3) 124,12<br>(10-4) 9,12<br>10-5 0, 0<br>NT:6,1 | (10-3) 109,10<br>(10-4) 13,14<br>10-5 0, 0<br>NT:6,04 | 10-3 >300, >300<br>10-4 152, 157<br>10-5 15,14<br>Nc: 7,19<br>Nts: >100 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 7,09 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 7,09 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 7,09 |
| Staphylococcus aureus ATCC 6 538 | (10-6 ) 224,22<br>(10-7) 21,21<br>N:6,75 | (10-3) 118,11<br>(10-4) 13,16<br>10-5 0, 0<br>NT:6,07 | (10-3) 124,12<br>(10-4) 12,9<br>10-5 0, 0<br>NT:6,09 | 10-3 >300, >300<br>10-4 163, 162<br>10-5 15, 14<br>Nc: 7,21<br>Nts: >100 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 7,11 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 7,11 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 7,11 |
| Enterococcus hirae ATCC 10 541 | (10-6 ) 229,23<br>(10-7) 20,16<br>N:6,75 | (10-3) 98,98<br>(10-4) 13,16<br>10-5 0, 0<br>NT:5,99 | (10-3) 114,11<br>(10-4) 10,12<br>10-5 0, 0<br>NT:6,05 | 10-3 >300, >300<br>10-4 148, 145<br>10-5 13, 13<br>Nc: 7,16<br>Nts: >100 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 7,06 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 7,06 | 10-0 0, 0<br>10-1 0, 0<br>10-2 0, 0<br>Nd: < 0,10<br>Nts: 0<br>R: > 7,06 |

N : logarithme décimal du n° d'ufc par 0.05 ml de la suspension d'essai.
NT logarithme décimal du n° d'ufc par surface d'essai de l'essai de neutralisation.
NC : logarithme décimal du n° d'ufc par surface d'essai du contrôle de neutralisation.
Nc : logarithme décimal du n° d'ufc par surface d'essai pour le contrôle de l 'eau.
Nd : logarithme décimal du n° d'ufc par surface d'essai pour l'essai du désinfectant.
R : effet microbicide.

Comme **conclusion** nous tenons à indiquer que l'eau ozonisée de l'équipement en étude:

- Respecte la norme UNE-EN 13697:2015 + A1:2020 (bactéricide) sous des conditions sales, aux concentrations de 100 %, 95 %, 90 % à un temps de contact de 5 minutes face à: *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli et Enterococcus hirae*.

- Respecte la norme UNE-EN 13697:2015 + A1:2020 (fongicide) sous des conditions sales, aux concentrations de 100 %, 95 %, 90 % à un temps de contact de 15 minutes face à: *Candida albicans* et *Aspergillus niger*.

À Oviedo, le 28 juillet 2022



Sara Aguirre Bastarrica
Licenciée en Médecine Vétérinaire
Inscrite à l'Ordre sous le n° 33/1616
inoQua | Institut de Santé Alimentaire

AGUIRRE BASTARRICA SARA - 09414412Y

Firmado digitalmente por AGUIRRE BASTARRICA SARA - 09414412Y
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, serialNumber=IDCES-09414412Y, givenName=SARA, sn=AGUIRRE BASTARRICA, cn=AGUIRRE BASTARRICA SARA - 09414412Y
Fecha: 2022.07.28 17:50:53 +02'00'

# ESSAI ACTIVITÉ VIRUCIDE
# Norme UNE-EN 14476:2019 + A2

**Réalisation de l'essai: 07/03/2022**
**Rapport analytique: 4303/22**

## Metodología

La méthode stipulée dans ladite norme pour évaluer l'activité virucide de l'eau ozonisée est fondée sur le calcul de la réduction de l'infectivité des différents virus qui ont été soumis à l'action de l'eau ozonisée.

Pour ce faire, une solution est préparée avec plusieurs types de virus avec des substances qui interfèrent qui doit être appliquée sur l'échantillon d'eau ozonisée pure et/ou diluée avec de l'eau dure (300 mg/Kg $CaCo_3$). L'essai est réalisé dans les concentrations suivantes : 100 %, 95 % et 90 %.

Le mélange est maintenu à une température spécifique et au long d'une période de temps définie. Une fois écoulée la durée de contact, une aliquote du mélange est prise, ce qui neutralise immédiatement l'action virucide de l'eau ozonisée en utilisant une méthode valable (dilution de l'échantillon dans un milieu qui conserve les cellules à la température de la glace).

Les différentes dilutions sont transférées aux cultures cellulaires (plaques pétri, tubes, ou cuvettes de plaques microtitre) que ce soit en monocouche ou en suspension cellulaire. Les essais d'infectivité sont effectués soit à travers des essais à la plaque soit à travers des essais quantales.

Suite à l'incubation, et à l'usage de la méthode de Spearman-Kärber ou les décomptes à la plaque, les titres d'infectivité sont calculés et évalués.

La réduction de l'infectivité du virus est calculée à partir des différences des logarithmes des titres viraux avant (contrôle du virus) et suite au traitement avec de l'eau ozonisée.

La substance qui interfère utilisée est une solution aqueuse d'albumine bovine (3g/L) qui simulerait la saleté pouvant exister sur le milieu qui fait l'objet de désinfection où les virus sont suspendus.

L'essai a été réalisé à une température comprise entre les 20°C ± l°C et les 70°C ± l°C.

Les temps de contact ont été de 5, 15, 30 et 60 minutes ± 10 secondes.

Les températures d'incubation ont été de 36°C ± 1°C et 37°C ± 1°C.

# Résultats

L'eau ozonisée dudit équipement respecte la norme UNE-EN 14476:2019 + A2 pour les concentrations et temps d'actions suivantes:

- **<u>Sous des conditions propres pour:</u>**
  - ECBO virus 100% 5 min.
  - Rotavirus 100% 15 min.
  - Vaccina virus 100% 5 min.
  - Polyoma virus SV 40 100% 5 min.
  - Bacteriofagos para Lactobacillus 95% 15min
  - Poliovirus 95% 5 min.
  - Adenovirus 100% 5 min.
  - Norovirus 100% 5 min
  - Hepatitis B(HBV) 100% 5 min

- **<u>Sous des conditions sales pour:</u>**
  - Influenza A (H7N9) 100% 15 min.
  - Coronavirus 100% 5 min
  - Virus del papiloma humano (VPH): 100% 5min

À Oviedo, le 16 mars 2022

Sara Aguirre Bastarrica
Licenciée en Médecine Vétérinaire
Inscrite à l'Ordre sous le n° 33/1616
inoQua | Institut de Santé Alimentaire

AGUIRRE BASTARRICA SARA - 09414412Y

Firmado digitalmente por AGUIRRE BASTARRICA SARA - 09414412Y
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, serialNumber=IDCES-09414412Y, givenName=SARA, sn=AGUIRRE BASTARRICA, cn=AGUIRRE BASTARRICA SARA - 09414412Y
Fecha: 2022.03.18 11:51:43 +01'00'

**Notes**:

- Les résultats de cette étude ne font foi que des échantillons analysés.
- La reproduction totale ou partielle du présent rapport n'est pas permise sans l'autorisation écrite préalable de son auteur.
- Les échantillons ont été analysés dans un laboratoire agréé par le Ministère régional de la Santé et Services Sanitaires de la Principauté des Asturies, comme laboratoire privé indépendant d'analyse et contrôle sanitaire d'aliments, eaux et boissons, sous le numéro de registre 05/O, à compter du mois de février 1997, certifié par l'ENAC, conformément à la réglementation UNE-EN ISO/IEC 17025, pour la réalisation d'essais dans le secteur environnemental, selon ce qui a été indiqué dans le certificat numéro 780/LE1514, depuis mars 2010 et par l'entité collaboratrice de l'Administration Hydraulique en matière de contrôle et surveillance de qualité des eaux et de gestion des déversements dans le domaine public hydraulique à l'abri de l'Ordre MAM/985/2006.