

RAPPORT D'ESSAI

DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE DU PRODUIT F010760V2 SELON LA NORME EN 14476+A2:2019

Délivré à Mme CHAKCHOUK

Pour : **FRANKLAB**
3 avenue des Frênes
78180 MONTIGNY LE BRETONNEUX
FRANCE



Demande d'essai du : 06/09/2021

Références du dossier d'analyses : n°235D42-2021-03

TESTS VIRUCIDES :

Conformément à la norme NF EN 14476+A2 (Juillet 2019) – antiseptiques et désinfectants chimiques – Essais quantitatifs de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide dans le domaine médical.

Essais sur 1 souche de référence : *Vaccinia* virus.

Ce rapport comporte 9 pages et ne concerne que les échantillons étudiés.

Date d'émission : 29/11/2021

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

SOMMAIRE

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS	3
2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS.....	3
3. CONDITIONS EXPERIMENTALES	3
4. VALIDATION DE LA METHODE	4
5. ESSAIS PROPREMENT DITS – CALCUL DE L'ACTIVITE VIRUCIDE.....	5
6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE	5
7. CONCLUSION	6
8. ANNEXE 1	6
9. ANNEXE 2	7

<u>Rédacteur</u>	<u>Superviseur</u>
Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire	Mme Stephanie MOROT-BIZOT, directrice
	

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS

APEX BIOSOLUTIONS
 3, RUE DE LA TERRE ROUGE
 Espace industriel de Beaupré
 25 220 ROCHE LEZ BEAUPRE
 FRANCE

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

Echantillon	N° lot
F010760V2	7377

Date limite d'utilisation optimale : non communiquée

Fabricant : FRANKLAB

Date de fabrication : non communiquée

Conditions de stockage : Température ambiante et obscurité.

Composants actifs : ammonium quaternaire

Aspect : liquide transparent

Précautions d'emploi : aucune

Diluant préconisé par le fabricant : eau potable

Date de réception au laboratoire : 17/08/2021

Période de l'étude : du 30/08/2021 au 05/10/2021

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

Température d'essai: 20°C ± 1°C

Méthode de titrage: log TCID₅₀

Temps de contact : 5 min - 10 min et 15 min

Concentration finale: 0,25% et 0,50%

Diluant du produit utilisé lors des essais: eau dure

Souche virale : Vaccinia virus ATCC VR-1508, cultivé sur cellules BHK-21 - sous atmosphère à 5% CO₂

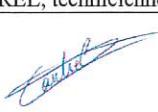
Substances interférentes : 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton (conditions de saleté)

Stabilité du produit en présence de substance interférente : bonne

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

Titre viral :

Titrage du virus de la vaccine par effet cytopathique des virus (calculé selon la méthode de Spearman-Kärber) = 6,750 log TCID₅₀

Rédacteur	Superviseur
Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire 	Mme Stephanie MOROT-BIZOT, directrice 

4. VALIDATION DE LA METHODE

a) Cytotoxicité

Les cellules ont été exposées au produit F010760V2 et une faible toxicité a été observée :

- Pour le Vaccinia virus, 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.

Le produit testé à la concentration indiquée ne montre pas d'influence notable sur la méthode de titrage des virus (différence $< 1 \log$) :

		Titre de virus (log DICT ₅₀)		
Dilution du produit		Suspension virale sur cellules non traitées	Suspension virale sur cellules traitées	Différence de titre viral (log DICT ₅₀)
F010760V2 10^{-2}		6,750	6,125	0,625

c) Validations de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit (la méthode est validée si la différence est $\leq 0,5 \log$):

Concentration du produit	Substances interférentes	Titre de virus (log DICT ₅₀)	Différence avec la suspension virale d'essai
F010760V2	3 g/L BSA + 3 mL/L EM	ESSAI 1: 6,750	0,00
		ESSAI 2: 6,750	0,00

d) Essai d'inactivation de référence

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.

Formaldehyde 0,7%	Titre de virus (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral (log DICT ₅₀)
Suspension virale témoin	6,750	
inactivation 5 min	6,000	0,750
inactivation 15 min	5,500	1,250
inactivation 30 min	4,750	2,000

Rédacteur	Superviseur
Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire	Mme Stephanie MOROT-BIZOT, directrice
	

5. ESSAIS PROPREMENT DITS – CALCUL DE L'ACTIVITE VIRUCIDE

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

ESSAI 1 - La suspension virale témoin a une concentration de 6,750 log TCID₅₀.

PRODUIT	Concentration	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral
F010760V2	0,50%	5 min	20°C	2,000	4,750
	0,25%	15 min		2,500	4,250
		10 min		2,625	4,125
		5 min		3,500	3,250

ESSAI 2 - La suspension virale témoin a une concentration de 6,750 log TCID₅₀.

PRODUIT	Concentration	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral
F010760V2	0,50%	5 min	20°C	1,875	4,875
	0,25%	15 min		2,375	4,375
		10 min		2,500	4,250
		5 min		3,750	3,000

6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE

Les essais ont été validés selon la norme européenne EN 14476+A2 :2019:

- 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 6,750 log TCID₅₀ pour le Vaccinia virus
- 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 (-4,5 après 60 min pour le poliovirus) :
 - la différence est de 2,000 log après 30 min d'inactivation par le formaldéhyde pour le Vaccinia virus
- Le produit testé n'affecte pas significativement la morphologie des cellules.
- Les conditions d'essai en saleté (3 g/L BSA + 3 mL/L EM) n'affectent pas l'infectivité du virus testé.
- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité des cellules au virus. Pour le Vaccinia virus, la différence est de 0,625 log.

Rédacteur	Superviseur
Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire	Mme Stephanie MOROT-BIZOT, directrice
	

7. CONCLUSION

Les essais réalisés sur le produit F010760V2, lot 7377 ont démontré :

- Que le produit F010760V2, employé dès 0,25% a une activité virucide sur le *Vaccinia virus*, selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A2 :2019, pour 10 min de contact et dès 0,50% pour 5 min de contact à 20°C, en conditions de saleté.
- Que conformément à la norme EN 14476+A2 :2019, le produit F010760V2, est donc par conséquent efficace sur tous les virus enveloppés, dès 0,25% pour 10 min de contact et dès 0,50% pour 5 min de contact, à 20°C, en conditions de saleté (point 4, tableau 1 page 9 « L'essai portant sur "l'activité virucide contre les virus enveloppés [avec le virus de la vaccine comme virus modèle]" couvrira uniquement tous les virus enveloppés »)

8. ANNEXE 1

Vaccinia virus:

Lignée cellulaire : cellules BHK 21 (HPA réf. 85011433, lot n°09I007)

Souche virale: *Vaccinia virus* (ATCC réf. VR-1508, lot n°5016818)

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
- MEM media, Sigma Aldrich, réf. 0268, lot n° 040M8301
- DMEM media, Sigma Aldrich, réf. D5796, lot n° RNBB9336
- Sérum de veau fœtal, Sigma Aldrich, F7524, lot n° 098K3397

Réactifs:

- Sérum albumine bovine en poudre, Dominique DUTSCHER, réf. 871001, lot D1304039
- Sang de mouton, Analytic Lab, réf. 08449, lot n°bcbj3984V

Solution d'inactivation :

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

Rédacteur	Superviseur
Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire 	Mme Stephanie MOROT-BIZOT, directrice 

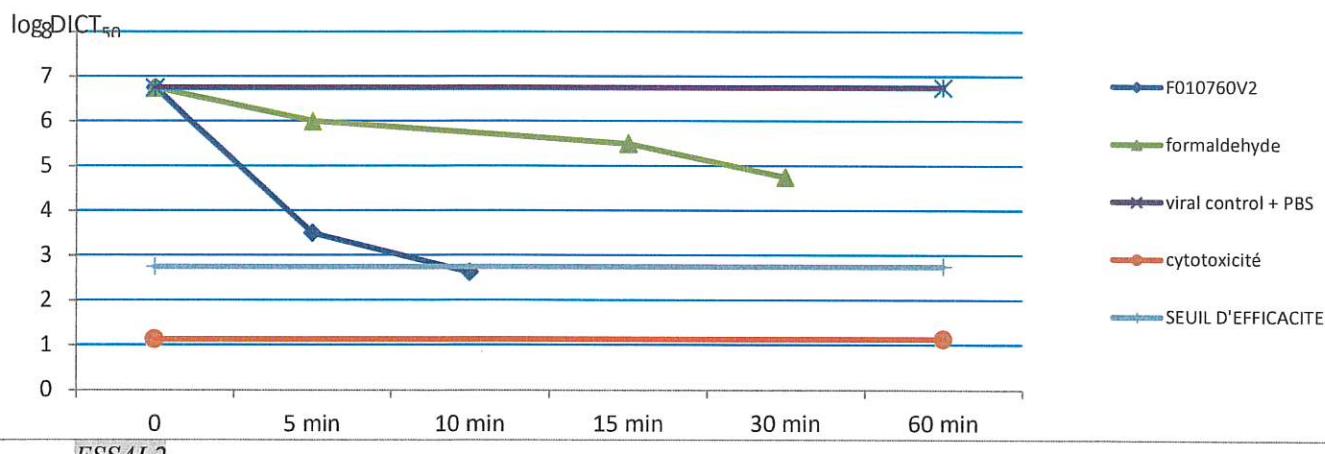
9. ANNEXE 2

Table A1 – Titrage du Vaccinia virus par effet cytopathique, par la méthode de calcul Spaerman-Kärber :Log DICT₅₀ = 6,750

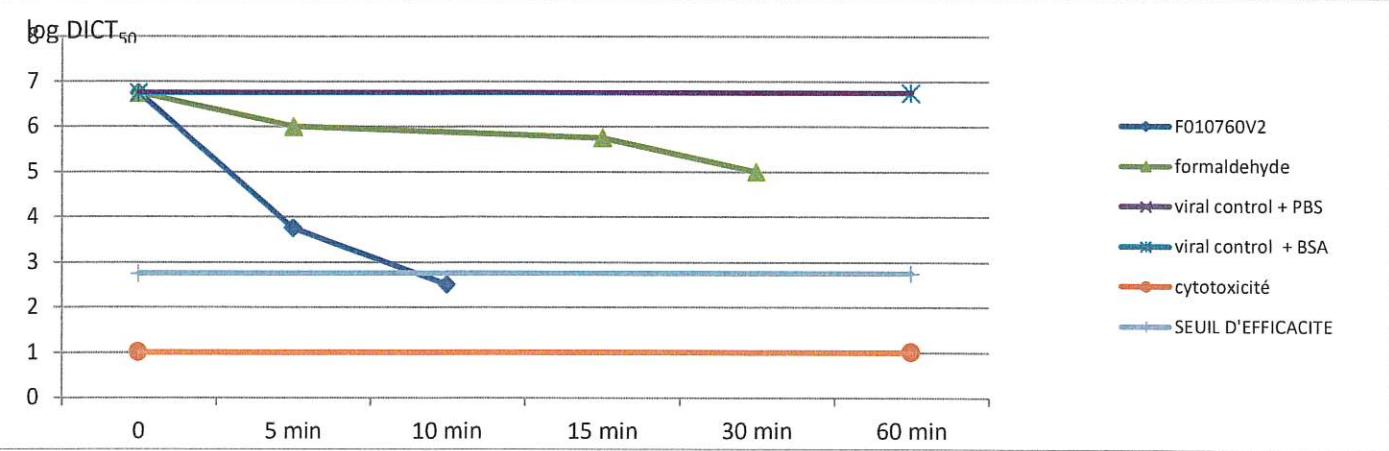
Dilution (- log)	Résultat	% résultats positifs
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	44444444	100
-6	44444444	100
-7	44000000	25
-8	00000000	0
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Somme des % de cultures positives		425

Figure 1 – représentations graphiques des résultats des essais :

ESSAI 1



ESSAI 2



Rédacteur	Superviseur
Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire	Mme Stephanie MOROT-BIZOT, directrice

Tableau A2— Résultats sur Vaccinia virus en conditions de saleté

PRODUIT	Concentration	Substance interférente	Niveau de cytotoxicité	Lg TCID ₅₀						Reduction
				0	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	
F010760V2 ESSAI 1	0,25%	3 g/L BSA + 3 mL/L SE	1,125	6,750	3,500	2,625	2,500	N.T.	N.T.	10 min R = 4,125
F010760V2 ESSAI 2	0,25%	3 g/L BSA + 3 mL/L SE	1,000	6,750	3,750	2,500	2,375	N.T.	N.T.	10 min R = 4,250
Formaldéhyde ESSAI 1	0,70%	PBS	1,625	6,750	6,000	N.T.	5,500	4,750	N.T.	
Formaldéhyde ESSAI 2	0,70%	PBS	1,750	6,750	6,000	N.T.	5,750	5,000	N.T.	
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 1	N.A.	PBS	N.A.	6,750	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,750	
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 1	N.A.	3 g/L BSA + 3 mL/L SE	N.A.	6,750	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,750	
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 2	N.A.	PBS	N.A.	6,750	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,750	
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 2	N.A.	3 g/L BSA + 3 mL/L SE	N.A.	6,750	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,750	
Sensibilité des cellules au virus	10 ⁻²	N.A.	Cellules non traitées	6,750						
		N.A.	Cellules traitées	6,125						

Tableau A3 – Sensibilité des cellules au Vaccinia virus:

PRODUIT	Dilution	Substance interférente		Dilutions							
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9
F010760V2	10 ⁻²	3 g/L BSA + 3 mL/L EM	Cellules non traitées	4444	4444	4444	4444	4444	4400	0000	0000
			Cellules traitées	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000
			Cellules traitées	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000
			Cellules traitées	4444	4444	4444	4444	4000	0000	0000	0000

Rédacteur	Superviseur
Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire	Mme Stephanie MOROT-BIZOT, directrice
	

Tableau A4 — Résultats bruts

ESSAI 1	Concentration	Substance interférente	Temps de contact	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	
F010760V2 ESSAI 1	0,50%	3 g/L BSA + 3 mL/L EM	5 min	4444 4444	4444 0000	0000 0000							
			15 min	4444 4444	4444 4444	0000 0000							
	0,25%		10 min	4444 4444	4444 4444	4000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	
			5 min	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	
	CONTRÔLE VIRAL			4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	
F010760V2 cytotoxicité	0,50%	3 g/L BSA + 3 mL/L EM	N.A.	4444 4000	0000 0000								
Formaldéhyde	0,70%	PBS	5	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	
			15	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	
			30	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	
Formaldéhyde (cytotoxicité)	0,70%	PBS	N.A.	4444 4444	4000 0000	0000 0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	
Contrôle viral d'infectivité	N.A.	PBS	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	
			0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	
Contrôle viral d'infectivité	N.A.	3 g/L BSA + 3 mL/L EM	60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	

ESSAI 2	Concentration	Substance interférente	Temps de contact	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	
F010760V2 ESSAI 2	0,50%	3 g/L BSA + 3 mL/L EM	5 min	4444 4444	4440 0000	0000 0000							
			15 min	4444 4444	4444 4440	0000 0000							
	0,25%		10 min	4444 4444	4444 4444	0000 0000							
			5 min	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	
	CONTRÔLE VIRAL			4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	
F010760V2 cytotoxicité	0,50%	3 g/L BSA + 3 mL/L EM	N.A.	4444 4000	0000 0000								
Formaldéhyde	0,70%	PBS	5	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	
			15	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	
			30	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	
Formaldéhyde (cytotoxicité)	0,70%	PBS	N.A.	4444 4444	4400 0000	0000 0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	
Contrôle viral d'infectivité	N.A.	PBS	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	
			0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	
Contrôle viral d'infectivité	N.A.	3 g/L BSA + 3 mL/L EM	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	

Rédacteur	Superviseur
Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire	Mme Stephanie MOROT-BIZOT, directrice