

Laboratoire de Virologie EA3610
CHU de Lille – Université de Lille
Centre Paul Boulanger, Hôpital A. Calmette
Bd du Pr Jules Leclercq
59037 Lille Cedex
France
Tel : (33) 03.20.44.66.88/48.93/69.30
Fax : (33) 03.20.44.48.95
Email : didier.hober@chru-lille.fr

N° de rapport : 2021/0311-01
Date d'édition : 09/04/2021

RAPPORT D'ESSAI / TRIAL REPORT

**Détermination de l'activité virucide de la Formule 2122
associée au procédé AEROSEPT 500**

**Selon la Norme NF EN 17272 (Avril 2020)
Vis à vis du Norovirus Murin**

*Evaluation of the virucidal effect of the Formula 2122
with the process AEROSEPT 500*

*Test method according to the standard NF EN 17272 (April 2020)
Against the Murin Norovirus*

Rapport pour / Report submitted to:

**LABORATOIRES ANIOS SAS
Pavé du moulin
59260 Lille Hellemmes
France**

Ce rapport d'essai ne concerne que le produit (cité ci-après) soumis à l'essai.
This trial report concerns only the product (quoted this later) subjected on approval

Ce document comporte 10 pages numérotées et 1 annexe de 3 pages
This report is made of 10 numbered pages and 1 annex of 3 pages

La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous la forme de fac- similé photographique
intégral. Seule la version électronique fait foi.
*The reproduction of this trial report is authorized only under the shape of complete photographic reproduction
Only the electronic version is valid.*

I- Introduction / Introduction

A la demande de la société Laboratoires ANIOS SAS, l'activité virucide de la Formule **2122** diffusée par voie aérienne à l'aide du procédé **Aerosept 500**, a été évaluée vis-à-vis de la souche S-99 du Norovirus Murin. L'essai a été effectué selon la norme NF EN 17272 : Antiseptiques et désinfectants chimiques – Méthodes de désinfection des pièces par voie aérienne par des procédés automatisés – Détermination de l'activité bactéricide, fongicide, levuricide, sporicide, tuberculocide, mycobactéricide, virucide et phagocide – Avril 2020.

*As requested by the Laboratoires ANIOS SAS Society, the virucidal activity of the Formula **2122** diffused by airborne methods using the process **Aerosept 500**, was evaluated against Murin Norovirus S-99 strain. The testing was carried out in accordance with the standard NF EN 17272: Chemical disinfectants and antiseptics - Methods of airborne room disinfection by automated process – Determination of bactericidal, mycobactericidal, sporicidal, fungicidal, yeastocidal, virucidal and phagocidal activities – April 2020.*

II- Identification du produit / Identification of sample

- Code formule / Code Formula : **2122**
- N° de lot – N° de formule / Lot N° - Formula N° : **C269 81S**
- Fabricant / Manufacturer : Laboratoires ANIOS SAS
- Aspect du produit / Appearance of the product : Liquide limpide et incolore / Clear and colourless liquid
- Substances actives / Active substances :
 - Acide peracétique / Peracetic acid (CAS : 79-21-0) : +/- 1200 ppm / +/- 1200 ppm
- pH du produit / pH Value : Non Dilué (20°C) pH=1,80 / Undiluted (20°C) pH=1.80
- Conditions de stockage / Storage conditions : Température ambiante, à l'abri de la lumière / Room temperature and darkness
- Application / Use : Désinfection des surfaces et des dispositifs médicaux / Disinfection of surfaces and medical devices.

III- Conditions expérimentales / Experimental conditions

- Période d'essai / *Period of analysis* : du 18/11/20 au 23/11/20 / Through 11/18/20 to 11/23/20
- Appareil / *Apparatus* : **Aerosept 500**
- Numéro de série / *Serial number* : **ASP 277**
- Dosage / *Concentration* : **7 ml/m³**
- Quantité de produit utilisé lors de l'essai / *Quantity of product used during the test* : **567.9 ml**
- Temps de diffusion du produit / *Time of diffusion of the product* : **36 minutes / minutes**
- Temps d'exposition des supports d'essais / *Exposure time of the carriers* : **60 minutes / minutes**
- Temps de contact de la désinfection par voie aérienne (CDVA) / *Contact time of the airborne disinfection (CDVA)* : **96 minutes / minutes**
- Dimension du local d'essai / *Test room size* : L (l) : 5.90 m, L (w) : 4.80 m, H (h) : 2.80 m
- Volume du local d'essai / *Volume of the test room* : **79 m³**
(Exigence obligatoire / *Obligatory requirements* : 30 à / to 150 m³)
- Température d'essai / *Test temperature* : (Exigences avant essai / *Requirements before testing* : 20°C ± 2°C) :
 - Avant essai / *Before testing* : **20.6°C**
- Hygrométrie / *Humidity* : (Exigences avant essai / *Requirements before testing* : 40 à / to 80%)
 - Avant essai / *Before testing* : **65.6% HR**
- Nature du support / *Nature of the carrier* : inox - 4 cm de diamètre / *stainless steel – 4 cm diameter*
- Distance par rapport à la source / *Distance to the source* : 3.90 m sur hauteur comprise entre / *on height between* 1 m et 1.50 m (Cf Annexe B – EN 17272 – Avril 2020 / *See Annex B – EN 17272 – April 2020*)
- Substances interférentes / *Interfering substances* : Conditions de propreté : Solution de sérum albumine bovine sérique (SAB) à la concentration finale dans l'essai de 0,3 g de SAB par litre / *Clean conditions :Bovine serum albumin (BSA) at final concentration of 0.3 g of BSA per liter in test*
 - Liquide de récupération / *recovery liquid* : Milieu de culture / *Culture medium*
 - Volume du liquide de récupération / *Recovery liquid volume* : 20 ml
 - Méthode de récupération / *Recovery method* : Agitation + grattage des supports pendant 1 minute / *Shaking + scrapping of the support during 1 minute*

IV- Matériel et Méthodes / Material and methods

1- Matériel / Material

a) Virus / Virus

La souche S-99 de Norovirus Murin, provient du Friedrich-Loeffler Institut (Greifswald-Insel Riems, Allemagne).

The Murin Norovirus strain S-99 was obtained from the Friedrich-Loeffler Institut (Greifswald-Insel Riems, Deutschland).

- Numéro de lot interne / *internal lot number* : Lot MNV-280120A-PE (P03)
- Titre de la suspension d'essai / *Viral title of the assay supernatant* : $10^{8,50}$ DICT₅₀/ml / $10^{8,50}$ TCID₅₀/ml

b) Lignée cellulaire / Cell line

La lignée cellulaire Raw 264.7 (ATCC TIB-71) utilisée pour cultiver le Norovirus Murin provient de l'European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France).

The Raw 264.7 cell line (ATCC TIB-71) used with the Murin Norovirus was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France).

Nombre de passage / *passage number* : Subculture P29-29

2- Méthodes d'essai / Methods

a) Titrage viral / Determination of the viral infectivity

Les suspensions virales récupérées des supports traitées ou non traitées par le produit à tester sont diluées en série de 10^{-1} à 10^{-8} , dans du Milieu MEM de Eagle modifié Dulbecco (DMEM, Invitrogen, France) avec 2% de sérum de veau foetal (SVF, Invitrogen, France) glacé. 0,1 ml de chaque dilution est ensuite transféré dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établi de cellules Raw 264.7, en commençant par la dilution la plus élevée. Après une heure d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est additionné à chaque puits. La lecture de l'effet cytopathogène (ECP) se fait au microscope inversé après 5 et 7 jours d'incubation. Le calcul du titre de l'infectivité virale (\log_{10} DICT₅₀/ml) est déterminé par la méthode Spearman-Kärber.

The viral suspensions recovered from carriers treated or non-treated with the product were diluted from 10^{-1} to 10^{-8} in ice-cold Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, France) containing 2% fetal calf serum (FCS, Invitrogen, France). 0.1 ml of each dilution was transferred, beginning with the highest dilution, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established Raw 264.7 monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytopathic effect (CPE) was read by using an inverted microscope after 5 and 7 days in a 5% CO₂-atmosphere. Calculation of estimated virus concentration (\log_{10} TCID₅₀/ml) was carried out by the Spearman-Kärber method.

b) Mesure de l'activité virucide du produit / Determination of the virucidal activity

Les essais consistent à déposer 50µl de suspension virale composée de 9 volumes de virus mélangés avec 1 volume de substance interférente sur trois supports en inox (P1, P2 et P3), puis à laisser sécher les supports à 20°C +/- 2°C sous une hotte à flux

laminaire. Les supports secs sont ensuite exposés au produit diffusé par voie aérienne à l'aide du procédé Aerosept 500. Deux témoins virus (T1 et T2) sont réalisés en laissant les supports sous la hotte à flux laminaire. Après le temps de contact à une température de 20°C +/- 2°C, les supports sont prélevés de la salle d'essai et les virus sont récupérés dans 20 ml de milieu de culture après agitation + grattage pendant 1 minute. La quantité de virus résiduel dans le filtrat est évaluée par la technique de titrage sur cellule Raw 264.7.

L'activité virucide du produit test est mesurée en calculant la chute du titre viral obtenu après traitement par comparaison avec les témoins de titrage obtenus en absence de désinfectant. Le résultat est exprimé en facteur de réduction (FR).

The tests consist to drop 50µl of virus suspension composed with 9 parts by volume of virus and 1 part by volume of interfering substances on three stainless steel carriers (P1, P2 and P3) and to dry the carriers at 20°C +/- 2°C under a laminar flow safety cabinet. Then the dry carriers are exposed to the product by airborne method using the process Aerosept 500. Two virus controls (T1 and T2) are obtained by leaving carriers under the safety cabinet. After the contact times at a temperature of 20°C +/- 2°C, carriers are collected from the test room and the virus are recovered from the carriers in 20 ml of culture medium by Shaking + scrapping of the support during 1 minute. The quantity of residual virus in the filtrate is evaluated by titration on Raw 264.7 cell.

The virucidal activity of the test disinfectant was evaluated by calculating the decrease in titre in comparison with the 2 control titration without disinfectant. The results are expressed as reduction factor (RF).

c) Sensibilité des cellules au virus / Cell sensitivity to the virus

L'essai consiste à déposer 50µl de milieu de culture contenant 1 volume de substance interférente sur deux supports en inox (S1 et S2), puis à laisser sécher les supports à 20°C +/- 2°C sous une hotte à flux laminaire. Les supports secs sont ensuite exposés au produit diffusé par voie aérienne à l'aide du procédé Aerosept 500. Après le temps de contact à une température de 20°C +/- 2°C, les supports sont prélevés de la salle d'essai et transférés dans 20 ml de milieu de culture afin de neutraliser l'action du désinfectant sur le support. Après agitation + grattage pendant 1 minute, 0,1 ml des solutions S1, S2 ou du PBS est distribué dans 8 x 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établie de cellules. Après 1 h à 37°C en présence de 5% de CO₂, le milieu de culture est éliminé des puits et 0,1 ml de virus dilués de 10⁻² à 10⁻⁹ dans du milieu à 2% de SVF, est distribué en parallèle sur les cellules traitées ou non traitées. La lecture de l'effet cytopathogène (ECP) se fait après 5 et 7 jours d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂ et l'infectivité virale est calculée.

The test consists to drop 50µl of culture medium with 1 part by volume of interfering substances on two stainless steel carriers (S1 and S2) and to dry the carriers at 20°C +/- 2°C under a laminar flow safety cabinet. Then the dry carriers are exposed to the product by airborne method using the process Aerosept 500. After the contact times at a temperature of 20°C +/- 2°C, carriers are collected from the test room and transferred in 20 ml of culture medium to neutralized the disinfectant activity on the carrier. After shaking + scrapping of the support during 1 minute, 0.1 ml of the solution S1, S2 or PBS are distributed onto 8 x 6 wells of a 96 wells microtitre plate with an established cell monolayer. After 1 h at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere, culture medium is removed from the wells and 0.1 ml of virus diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with culture medium containing 2% FCS was added on treated or untreated cells in parallel. The cytopathic effect (CPE) was read after incubation during 5 and 7 days at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere and estimated virus concentration was carried out.

d) Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / *Control of the efficiency for suppression of the disinfectant activity*

Un volume de suspension virale composée de 9 volumes de virus mélangés avec 1 volume de substance interférente est additionné à 1 volume des solutions S1 ou S2 précédentes ou à 1 volume d'eau distillée. Les mélanges sont ensuite incubés pendant 30 min à 20°C, puis sont dilués de 10^{-1} à 10^{-8} dans du milieu de culture glacé et la quantité de virus résiduel est évaluée par la technique de titrage sur cellule Raw 264.7.

One part by volume of virus suspension composed with 9 parts by volume of virus and 1 part by volume of interfering substances are mixed with 1 part by volume of the previous solutions S1 or S2 or 1 part by volume of distilled water. Then the mixtures are leaved during 30 min at 20°C and were diluted from 10^{-1} to 10^{-8} in ice-cold culture medium and the quantity of residual virus was evaluated by titration on Raw 264.7 cell.

V- Résultats / Results

1) Essai de distribution / distribution test :

Selon la norme EN 17272 (Avril 2020) Le procédé **Aerosept 500** associé à la formule **2122** à **7 ml/m³** permet d'atteindre l'activité revendiquée dans l'ensemble de la pièce vis-à-vis de la souche : **Staphylococcus aureus** en **30 minutes** de contact, en condition de propreté, dans conditions obligatoires de la norme. (Cf. Rapport 39712)

*According to the European standard EN 17272 (April 2020), the process **Aerosept 500** with the formula **2122** to **7 ml/m³** achieves the claimed activity throughout the room against **Staphylococcus aureus** after a **30 minute** contact time, in clean condition in the obligatory experimental conditions. (See: Report: 39712)*

2) Essai préliminaire / Preliminary test :

Recherche d'un effet inhibiteur sur support, éventuellement dû aux restes de désinfectant transportés par les supports.

Searching of an inhibiting effect on carrier, possibly due to the residues of disinfectant transported by the carriers.

a) Evaluation de la sensibilité des cellules au virus suite au traitement par la Formule **2122** / Evaluation of the cell sensitivity to the virus after treatment with the Formula **2122**

	Log ₁₀ DICT ₅₀ (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ (RF)
Cellules non traitées / Non treated cells	7.33 +/- 0.17
Cellules traitées avec la solution S1 / Treated cells with S1 solution	7.50 +/- 0.00 (-0.17 +/- 0.33)
Cellules traitées avec la solution S2 / Treated cells with S2 solution	7.33 +/- 0.27 (0.00 +/- 0.63)

Légende / legend :

FR/RF : Facteur de réduction (en log) / Reducing factor (log)

Interprétation / Interpretation

Si $FR < 1 \log_{10}$, les conditions expérimentales sont applicables lors de l'essai pour les quantités de produit mises en œuvre.

If $RF < 1 \log_{10}$, the experimental conditions are usable during the test for the quantities of product used.

b) Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / Control of the efficiency for suppression of the disinfectant activity

Produit / Product	Solution / Solution	Log ₁₀ DICT ₅₀ (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ (RF)
Témoin virus / Virus control	n.a.	7.17 +/- 0.21
Formule 2122 / Formula 2122	S1	6.83 +/- 0.21 (0.34 +/- 0.60)
Formule 2122 / Formula 2122	S2	7.00 +/- 0.22 (0.17 +/- 0.61)

Légende / legend :

FR/RF : Facteur de réduction (en log) / Reducing factor (log)

Interprétation / Interpretation

Si $FR < 0,5 \log_{10}$, les conditions expérimentales sont applicables lors de l'essai pour les quantités de produit mises en œuvre.

If $RF < 0.5 \log_{10}$, the experimental conditions are usable during the test for the quantities of product used.

2) Evaluation de l'effet virucide de la Formule 2122 / Evaluation of the virucidal activity of the Formula 2122 :

Tableau des résultats de virucidie de la Formule 2122 par voie aérienne sur le Norovirus Murin S-99 en conditions de propreté

Table on the virucidal activity of the Formula 2122 in airborne conditions against Murin Norovirus S-99 in clean conditions

Produit / Product	Substance interférente / Interfering solution	Support / Carrier	Log ₁₀ DICT ₅₀ après xx min (FR) / Log ₁₀ TCID ₅₀ after xx min (RF)		≥4 log réduction après xx min / ≥4 log reduction after xx min
			60	Moy. / Mean	
Témoin virus / Virus control		T1	4.83 +/- 0.21	4.92 +/- 0.22	n.a.
		T2	5.00 +/- 0.22		n.a.
Formule 2122 / Formula 2122	0,3 g/l SAB / 0.3 g/l BSA	P1	0.50 +/- 0.00 (4.42* +/- 0.43)	n.a.	≥60 min
		P2	0.50 +/- 0.00 (4.25* +/- 0.43)	n.a.	≥60 min
		P3	0.50 +/- 0.00 (4.25* +/- 0.43)	n.a.	≥60 min

Légende / legend :

n.a. : non applicable / non applicable

* : FR calculé à partir de la moyenne des témoins virus / RF evaluated using the mean of the virus control

Interprétation / Interpretation

Taux de réduction minimum sur les virus (activité virucide) : FR ≥ 4 log₁₀

Minimal reduction rate on virus (virucidal activity): RF ≥ 4 log₁₀

VI- Conclusion / Conclusion

Le procédé **Aerosept 500** associé à la Formule **2122** à 7 ml/m³ présente une activité virucide vis-à-vis du Norovirus Murin S-99 en **60 minutes** de contact, selon la norme NF EN 17272 (Avril 2020) dans les conditions obligatoires de la norme.

*The process **Aerosept 500** with the Formula **2122** at 7 ml/m³ presents a virucidal activity against the Murin Norovirus S-99 after **60 minutes** of exposure time, according to the standard NF EN 17272 (April 2020) in the obligatory conditions of the standard.*

Lille, le 09 avril 2021

Responsable technique



Dr. P. E. LOBERT

Chef de Service

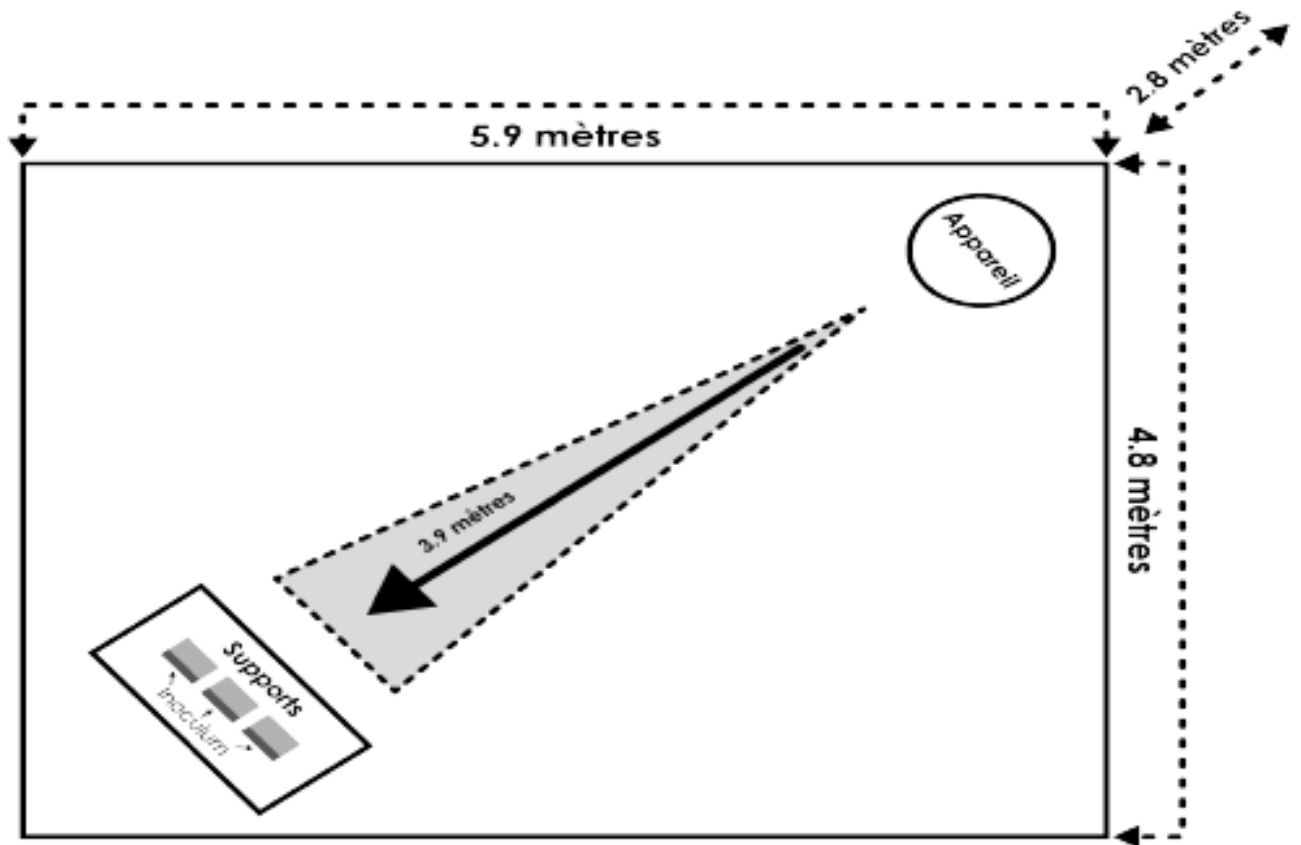


Pr. D. HOBER

Fin du rapport (rapport complet) / *End of the report (complet report)*

Annexe / Annex

Schéma de la salle / Diagram of the room



Données expérimentales / Experimental data

- Titre de la suspension d'essai / Viral title of the assay supernatant :

Produit / Product	Dilution (log) ^(a)							
	2	3	4	5	6	7	8	9
Suspension d'essai / <i>essai supernatant</i>	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	0 0	0 0
	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	0 0	0 0
	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	0 0	0 0

- Evaluation de la sensibilité des cellules au virus suite au traitement par la Formule 2122
/ Evaluation of the cell sensitivity to the virus after treatment with the Formula 2122

Méthode / Method	Dilution (log) ^(a)							
	2	3	4	5	6	7	8	9
Cellules non traitées / Non treated cells	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	0 4 4	0 0 0	0 0 0
	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	0 0 0	0 0 0
Cellules traitées avec la solution S1 / <i>Treated cells with S1 solution</i>	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	0 0 0	0 0 0
	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	0 0 0	0 0 0
Cellules traitées avec la solution S2 / <i>Treated cells with S2 solution</i>	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 0	0 4 0	0 0 0
	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 0	0 0 0	0 0 0

Légende / legend :

(a) 1 à 4 : virus présents, degré de l'ECP dans 6 puits de plaques de microtitration
0 : aucun virus présent.

- Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant / Control of the efficiency for
suppression of the disinfectant activity

Produit / Product	Solution / Solution	Dilution (log) ^(a)							
		2	3	4	5	6	7	8	9
Témoin virus / <i>Virus control</i>	n.a.	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	0 0	0 0
		4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	0 4	0 0	0 0
		4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	0 4	0 0	0 0
Formule 2122 / <i>Formula 2122</i>	S1	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 0	0 0	0 0
		4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	0 0	0 0	0 0
		4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	0 4	0 0	0 0
Formule 2122 / <i>Formula 2122</i>	S2	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	0 0	0 0	0 0
		4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	0 4	0 0	0 0
		4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	4 4	0 0	0 0

Légende / legend :

(a) 1 à 4 : virus présents, degré de l'ECP dans 6 puits de plaques de microtitration
0 : aucun virus présent.

- Evaluation de l'effet virucide de la Formule 2122 / Evaluation of the virucidal activity of the Formula 2122

Produit / Product	Support / Carrier	Dilution (log) ^(a)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Témoin virus / Virus control	T1	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	0 0 4	0 0 0	0 0 0	0 0 0
		4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	0 0 4	0 0 0	0 0 0	0 0 0
	T2	4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	0 4 4	0 0 0	0 0 0	0 0 0
		4 4 4	4 4 4	4 4 4	4 4 4	0 0 4	0 0 0	0 0 0	0 0 0
Formule 2122 / Formula 2122	P1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
		0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
	P2	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
		0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
	P3	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
		0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0

Légende / legend :

- (a) 1 à 4 : virus présents, degré de l'ECP dans 6 puits de plaques de microtitration
0 : aucun virus présent.