

EQUIVALENCE ENZYMEX L9

Formula code	FRANKLAB Designation	Packaging	FRANKLAB Commercial reference
F01043EM4	ENZYMEX L9	5L can	1043505

PROCES-VERBAL NORME EN 13727 + A1 (2013)**Laboratoire ayant réalisé l'essai**

Laboratoire d'Hygiène Hospitalière
Centre de Biologie 6ème étage,
CHU de Clermont-Ferrand
63003 CLERMONT-FERRAND

Client

FRANKLAB
BP 63
78185 Saint-Quentin en Yvelines

Identification de l'échantillon de désinfectant

Nom du produit : F010435V4
Fabricant : Franklab
Diluant du produit dont l'utilisation est recommandée par le fabricant : Eau potable
Substance(s) active(s) : Non spécifié
Date de livraison du produit : 2/5/14
Date de péremption : Non renseigné
Période d'analyse : Du 21/5/14 au 31/7/14

-Résultats pour la souche Pseudomonas aeruginosa CIP 103.467**Résultats d'essai**

EN : 13727 (Phase 2, étape 1)

Nom du produit : F010435V4
N° Lot : L372-25/4/14
Fabricant : Franklab
Aspect du produit : Liquide, de couleur vert
Conditions de stockage (température, etc.) : Obscurité, température ambiante

Méthode par dilution-neutralisation:

Raisons du choix de la méthode : Méthode recommandée par la norme EN 13727
Neutralisant utilisé : Bouillon Lethen Réf VWR : 301580ZA
Température d'essai : 20°C
Substances interférentes : **Conditions de saleté (3 g/l d'albumine bovine et 3 ml/l de GRm)**
Souche d'essai : *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103.467
Gélose utilisée : Lethen Agar
Température d'incubation : 37°C
Date de l'essai : 29/7/14
Diluant utilisé pour les solutions d'essai du produit : Eau dure
Aspect des dilutions du produit : Incolore
Aspect du produit lors de l'essai : Absence de précipité

Validation et témoins

Remarques à propos des résultats

- ✓ Tous les témoins et le mélange de validation de la méthode donnent des valeurs comprises à l'intérieur des limites de base.
- ✓ Une concentration du produit au moins a présenté une réduction logarithmique d'au moins 5 log.
- ✓ Aucune formation de précipité durant la réalisation de l'essai.

-Résultats pour la souche Staphylococcus aureus CIP 4.83

Résultats d'essai

EN : 13727 (Phase 2, étape 1)

Nom du produit : F010435V4

N° Lot : L372-25/4/14

Fabricant : Franklab

Aspect du produit : Liquide, de couleur vert

Conditions de stockage (température, etc.) : Obscurité, température ambiante

Méthode par filtration sur membrane:

Raisons du choix de la méthode : Difficulté de neutralisation du produit soumis à l'essai

Liquide de rinçage utilisé : Eau distillée stérile (150ml)

Température d'essai : 20°C

Substances interférentes: Conditions de saleté (3 g/l d'albumine bovine et 3 ml/l de GRm)

Souche d'essai : Staphylococcus aureus CIP 4.83

Température d'incubation : 37°C

Date de l'essai : 21/5/14

Diluant utilisé pour les solutions d'essai du produit : Eau dure

Aspect des dilutions du produit: Incolore

Aspect du produit lors de l'essai: Absence de précipité

Validation et témoins

Suspension de validation (N _{vo})			Témoin des conditions expérimentales (A)			Témoin de filtration (B)			Validation de la méthode (C)		
V _{c1}	125	x̄ = 128	V _{c1}	151	x̄ = 142	V _{c1}	170	x̄ = 172	V _{c1}	137	x̄ = 148
V _{c2}	130		V _{c2}	133		V _{c2}	174		V _{c2}	158	
30 ≤ x̄ de N _{vo} ≤ 160 ?			x̄ de A est ≥ 0,5 × x̄ de N _{vo} ?			x̄ de B ≥ 0,0005 × N _{VB}			x̄ de C est ≥ 0,5 × x̄ de N _{vo} ?		
Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>			Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>			Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>			Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>		

V_c: Nombre d'UFC comptées/ml ; N : Nombre d'UFC dans la suspension d'essai ; N₀: Nombre d'UFC dans le mélange d'essai ; N_a: Nombre d'UFC dénombrées après contact avec le produit ; N_{vo}: Nombre d'UFC/ml dans la dilution de la suspension de validation ; R : Réduction du nombre de bactéries.

Comme indiqué dans la norme, la concentration du produit utilisée pour valider la norme est la concentration la plus élevée étudiée soit ici 1%.

Suspension d'essai et Essai

Suspension d'essai (N et N ₀)	N	V _{c1}	V _{c2}	$N = (500 + 479 + 52 + 51) / 2,2 \cdot 10^{-6} = 8,69 \log$ $N_0 = N/10 = 7,69 \log$ N_0 est compris entre 7,17 et 7,70 ?	<div style="display: inline-block; border: 1px solid black; padding: 2px;">Oui</div> <div style="display: inline-block; border: 1px solid black; padding: 2px; margin-left: 20px;">Non</div>
	10 ⁻⁶	500	479		<div style="display: inline-block; border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">X</div> <div style="display: inline-block; border: 1px solid black; padding: 2px; margin-left: 20px;"></div>
	10 ⁻⁷	52	51		

Conc. du produit	Temps de contact	V _{c1}	V _{c2}	$N_a = \bar{x} \times 10$	Log N _a	Log R (N ₀ = 7,69)
1%	5 minutes	0	0	<140	< 2,15	> 5,54
0,5%	5 minutes	0	0	<140	< 2,15	> 5,54
0,25%	5 minutes	0	0	<140	< 2,15	> 5,54
0,125%	5 minutes	0	0	<140	< 2,15	> 5,54

V_c : Nombre d'UFC comptées/ml ; N : Nombre d'UFC dans la suspension d'essai ; N₀ : Nombre d'UFC dans le mélange d'essai ; N_a : Nombre d'UFC dénombrées après contact avec le produit ; N_{vo} : Nombre d'UFC/ml dans la dilution de la suspension de validation ; R : Réduction du nombre de bactéries. Inc : Incomptable.

Contrôle des moyennes pondérées : $D = [(500 + 479) / 2] / [(52 + 51) / 2] = 9,50$
 9,50 est compris entre 5 et 15.

Remarques à propos des résultats

- ✓ Tous les témoins et le mélange de validation de la méthode donnent des valeurs comprises à l'intérieur des limites de base.
- ✓ Une concentration du produit au moins a présenté une réduction logarithmique d'au moins 5 log.
- ✓ Aucune formation de précipité durant la réalisation de l'essai.
- ✓ Les conditions d'essai testées n'ont pas permis de mettre en évidence de concentration non active.

-Résultats de la souche Enterococcus hirae CIP 58.55**Résultats d'essai**

EN : 13727 (Phase 2, étape 1)

Nom du produit : F010435V4

N° Lot : L372-25/4/14

Fabricant : Franklab

Aspect du produit : Liquide, de couleur vert

Conditions de stockage (température, etc.) : Obscurité, température ambiante

Méthode par filtration sur membrane:

Raisons du choix de la méthode : Difficulté de neutralisation du produit soumis à l'essai

Liquide de rinçage utilisé : Eau distillée stérile (150ml)

Température d'essai : 20°C

Substances interférentes: Conditions de saleté (3 g/l d'albumine bovine et 3 ml/l de GRm)

Souche d'essai : Enterococcus hirae CIP 58.55

Température d'incubation : 37°C

Date de l'essai : 26/6/14

Diluant utilisé pour les solutions d'essai du produit : Eau dure

Aspect des dilutions du produit: Incolore

Aspect du produit lors de l'essai: Absence de précipité

Validation et témoins

Suspension de validation (N _{vo})			Témoin des conditions expérimentales (A)			Témoin de filtration (B)			Validation de la méthode (C)		
V _{c1}	76	$\bar{x} = 83$	V _{c1}	34	$\bar{x} = 52$	V _{c1}	83	$\bar{x} = 87$	V _{c1}	107	$\bar{x} = 104$
V _{c2}	90		V _{c2}	70		V _{c2}	90		V _{c2}	101	
30 ≤ \bar{x} de N _{vo} ≤ 160 ?			\bar{x} de A est ≥ 0,5 × \bar{x} de N _{vo} ?			\bar{x} de B est ≥ 0,5 × \bar{x} de N _{vo} ?			\bar{x} de C est ≥ 0,5 × \bar{x} de N _{vo} ?		
Oui	<input checked="" type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	Oui	<input checked="" type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	Oui	<input checked="" type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	Oui	<input checked="" type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>

V_c : Nombre d'UFC comptées/ml ; N : Nombre d'UFC dans la suspension d'essai ; N₀ : Nombre d'UFC dans le mélange d'essai ; N_a : Nombre d'UFC dénombrées après contact avec le produit ; N_{vo} : Nombre d'UFC/ml dans la dilution de la suspension de validation ; R : Réduction du nombre de bactéries.

Comme indiqué dans la norme, la concentration du produit utilisée pour valider la norme est la concentration la plus élevée étudiée soit ici 1%.

Suspension d'essai et Essai

Suspension d'essai (N et N ₀)	N	V _{c1}	V _{c2}	$N = (323 + 338 + 40 + 43) / 2,2 \cdot 10^{-6} = 8,53 \log$ $N_0 = N/10 = 7,53 \log$ N_0 est compris entre 7,17 et 7,70 ?	<input checked="" type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
	10 ⁻⁶	323	338			
	10 ⁻⁷	40	43			

Conc. du produit	Temps de contact	V _{c1}	V _{c2}	$N_a = \bar{x} \times 10$	Log N _a	Log R (N ₀ = 7,53)
1%	5 minutes	0	0	<140	<2,15	>5,38
0,5%	5 minutes	0	0	<140	<2,15	>5,38
0,25%	5 minutes	1	0	<140	<2,15	>5,38
0,125%	5 minutes	0	0	<140	<2,15	>5,38
0,0625%	5 minutes	0	0	<140	<2,15	>5,38

V_c : Nombre d'UFC comptées/ml ; N : Nombre d'UFC dans la suspension d'essai ; N₀ : Nombre d'UFC dans le mélange d'essai ; N_a : Nombre d'UFC dénombrées après contact avec le produit ; N_{vo} : Nombre d'UFC/ml dans la dilution de la suspension de validation ; R : Réduction du nombre de bactéries. Inc : Incomptable.

Contrôle des moyennes pondérées : $D = [(323 + 338)/2] / [(40 + 43)/2] = 7,96$
 7,96 est compris entre 5 et 15.

Remarques à propos des résultats

- ✓ Tous les témoins et le mélange de validation de la méthode donnent des valeurs comprises à l'intérieur des limites de base.
- ✓ Une concentration du produit au moins a présenté une réduction logarithmique d'au moins 5 log.
- ✓ Aucune formation de précipité durant la réalisation de l'essai.
- ✓ Les conditions d'essai testées n'ont pas permis de mettre en évidence de concentration non active.


Conclusion

Des tests ont été effectués sur les souches référencées *Staphylococcus aureus* CIP 4.83, *Enterococcus hirae* CIP 58.55, *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103.467. Les essais ont été effectués une fois. La réduction avec la souche d'essai limitante *Pseudomonas aeruginosa* en 5 minutes à 0,25% est de $1,10 \cdot 10^5$ soit 5,04 log.

Conformément à la norme **EN 13727 + A1**, le lot **L372-25/4/14** du produit **F010435V4**, lorsqu'il est concentré à **0,25%** (V/V) dans de l'**eau dure** (Produit utilisé dilué), présente une activité **bactéricide en 5 minutes à 20°C**, dans les **conditions de saleté** (3 g/l d'albumine bovine et 3 ml/l de globules rouges de mouton), vis-à-vis de la souche référencée *Pseudomonas aeruginosa*, pour une activité de désinfection des dispositifs médicaux

Clermont-Ferrand, le 08/08/14.

Pr. O. TRAORÉ



RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE DU PRODUIT
F010435V4 SELON LA NORME EN 14561**

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du: 12/05/2015

Références du dossier d'analyses: n°140D10-2015-09

ESSAIS DE BACTERICIDIE :

Selon la méthodologie de la norme européenne NF EN 14561 (Mars 2007) – antiseptiques et désinfectants chimiques – essais quantitatifs de porte germes pour l'évaluation de l'activité bactéricide pour instruments utilisés en médecine humaine.

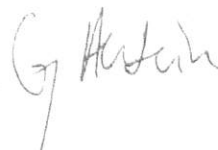
Essais sur 3 souches de référence: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus hirae* et *Staphylococcus aureus*.

Ce rapport comporte 17 pages et ne concerne que l'échantillon étudié.

Date d'émission : 24/06/2015

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

Professeur Georges HERBEIN
Professeur des Universités Praticien Hospitalier
Expert scientifique



SOMMAIRE

- LABORATOIRE AYANT REALISE LES ESSAIS
- IDENTIFICATION COMPLETE DE L'ECHANTILLON
- CONDITIONS EXPERIMENTALES
- VALIDATION DE LA METHODE ET RESULTATS PROPREMENT DITS
- CONCLUSIONS
- FEUILLES DE RESULTATS
- ANNEXE TECHNIQUE

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 BESANÇON

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

Echantillon	N° lot
F010435V4	L372-25/04/14B02

Echantillons reçus au laboratoire le 22/05/2015.

Date limite d'utilisation optimale: non précisé

Fabricant: FRANKLAB

Date de fabrication: non précisé

Conditions de stockage: Température ambiante et obscurité

Composants actifs: ammoniums quaternaires.

Aspect: liquide vert

Diluant préconisé par le fabricant: eau potable.

Période de l'étude: du 25/05/2015 au 03/06/2015

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

1. Concentrations du produit soumis à l'essai : 0,5%.
2. Méthode employée: dilution-neutralisation
3. Temps de contact: 5 min – 10 min - 60 min
4. Température d'essai: 20°C
5. Substance interférente: albumine bovine (3g/l) et érythrocytes de mouton (3 mL/L), conditions de saleté.
6. Diluant des suspensions bactériennes et des essais : solution tryptone sel stérile.
7. Souches bactériennes utilisées: *Staphylococcus aureus subsp. aureus* DSM 799 lot 0413(ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* DSM 939 lot 0413 (ATCC 15442) et *Enterococcus hirae* DSM 3320 lot 0511 (ATCC 10541)- DSMZ.

8. Conditions de culture des bactéries : sur géloses TSA (Tryptone Soja Agar), à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
9. Technique d'arrêt de l'action bactéricide : transfert du porte germe dans 10 ml de neutralisant à base de polysorbate 80 (30g/l) et de jaune d'œuf (5%) dans de l'eau distillée.

4. RESULTATS PROPRESMENT DITS

Voir feuilles de résultats.

SYNTHESE RESULTATS

Le produit F010435V4 est bien actif vis-à-vis des souches de référence utilisées, car la réduction moyenne obtenue est supérieure à 5 log pour les cellules bactériennes viables :

Sur produit à 0.5% pour 10 min de contact:

- pour *P aeruginosa*, $R > 5,22$
- pour *E. hirae*, $R > 5,27$
- pour *S. aureus*, $R > 5,22$

5. CONCLUSION

Conformément à la norme EN 14561 (Mars 2007), le produit F010435V4, lot n°L372-25/04/14B02:

- a une activité bactéricide sur les trois souches bactériennes de référence lorsqu'employé à 0.5%, pour 10 min de contact à 20°C , en conditions de saleté (3 g/l d'albumine bovine et 3 mL/L érythrocytes de mouton).



Suspension d'essai et essai

Suspension d'essai (N)			log N
10^{-7}	298	298	9,47
10^{-8}	29	30	
9,17 ≤ N ≤ 9,70?			
x oui □ non			

Témoïn eau (Nw)			log Nw
10^{-4}	240	237	7,38
7,15 ≤ Nw ≤ lg N-1,3?			
x oui □ non			

Vérifications de la méthodologie:

- N est compris entre $1,5 \times 10^9$ UFC/ml et $5,0 \times 10^9$ UFC/ml
- Nw est compris entre $1,4 \times 10^6$ UFC/ml et lg N-1,3
- Nv0 est compris entre 30 et 160 UFC/ml
- A, B et C sont égaux ou supérieurs à $0,5 \times Nv0$
- Le quotient des dénombrements moyens pondérés est compris entre 5 et 15

	Essais					
	0,5% 5 min		0,5% 10 min		0,5% 60 min	
10^0	49	48	12	13	0	0
10^{-1}	6	4	1	0	0	0
10^{-2}	1	0	0	0	0	0
10^{-3}	0	0	0	0	0	0
log Na	2,69		<2,15		<2,15	
log R = log Nw - log Na	4,69		>5,23		>5,23	

Légende :

Vc = dénombrement par ml

 \bar{x} = moyenne de Vc1 et Vc2

N = nombre d'UFC/ml dans la suspension d'essai

Nv = nombre d'UFC/ml dans la suspension de validation

A = nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation des conditions expérimentales

B = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de la toxicité du neutralisant

C = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de l'inactivation par dilution-neutralisation

Na = nombre d'UFC/ml des survivants après essai

R = réduction (lg R = lg N0 - lg Na)

Suspension d'essai et essai

Suspension d'essai (N)			log N
10^{-7}	294	299	9,47
10^{-8}	29	28	
9,17 ≤ N ≤ 9,70?			
x oui □ non			

Témoins eau (Nw)			log Nw
10^{-4}	218	226	7,35
7,15 ≤ Nw ≤ lg N-1,3?			
x oui □ non			

Vérifications de la méthodologie:

- N est compris entre $1,5 \times 10^9$ UFC/ml et $5,0 \times 10^9$ UFC/ml
- Nw est compris entre $1,4 \times 10^6$ UFC/ml et lg N-1,3
- Nv0 est compris entre 30 et 160 UFC/ml
- A, B et C sont égaux ou supérieurs à $0,5 \times Nv0$
- Le quotient des dénombrements moyens pondérés est compris entre 5 et 15

	Essais					
	0,5% 5 min		0,5% 10 min		0,5% 60 min	
10^0	49	55	8	7	0	0
10^{-1}	5	5	0	0	0	0
10^{-2}	0	0	0	0	0	0
10^{-3}	0	0	0	0	0	0
log Na	2,72		<2,15		<2,15	
log R = log Nw - log Na	4,63		>5,20		>5,20	

Légende :

- Vc = dénombrement par ml
 \bar{x} = moyenne de Vc1 et Vc2
N = nombre d'UFC/ml dans la suspension d'essai
Nv = nombre d'UFC/ml dans la suspension de validation
A = nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation des conditions expérimentales
B = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de la toxicité du neutralisant
C = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de l'inactivation par dilution-neutralisation
Na = nombre d'UFC/ml des survivants après essai
R = réduction (lg R = lg N0 - lg Na)

Suspension d'essai et essai

Suspension d'essai (N)			log N
10 ⁻⁷	290	289	9,46
10 ⁻⁸	30	32	
9,17 ≤ N ≤ 9,70?			
x oui □ non			

Témoin eau (Nw)			log Nw
10 ⁻⁴	225	227	7,35
7,15 ≤ Nw ≤ lg N-1,3?			
x oui □ non			

Vérifications de la méthodologie:

- N est compris entre 1,5 x 10⁹ UFC/ml et 5,0 x 10⁹ UFC/ml
- Nw est compris entre 1,4 x 10⁶ UFC/ml et lg N-1,3
- Nv0 est compris entre 30 et 160 UFC/ml
- A, B et C sont égaux ou supérieurs à 0,5 x Nv0
- Le quotient des dénombrements moyens pondérés est compris entre 5 et 15

	Essais					
	0,5% 5 min		0,5% 10 min		0,5% 60 min	
10 ⁰	55	51	15	8	0	0
10 ⁻¹	10	5	0	1	0	0
10 ⁻²	1	0	0	0	0	0
10 ⁻³	0	0	0	0	0	0
log Na	2,72		2,06		<2,15	
log R = log Nw - log Na	4,63		5,29		>5,21	

Légende :

- Vc = dénombrement par ml
- \bar{x} = moyenne de Vc1 et Vc2
- N = nombre d'UFC/ml dans la suspension d'essai
- Nv = nombre d'UFC/ml dans la suspension de validation
- A = nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation des conditions expérimentales
- B = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de la toxicité du neutralisant
- C = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de l'inactivation par dilution-neutralisation
- Na = nombre d'UFC/ml des survivants après essai
- R = réduction (lg R = lg N0 - lg Na)

F₄₀₂ - EN14561 - 01-22

Suspension d'essai et essai

Suspension d'essai (N)			log N
10^{-7}	281	289	9,45
10^{-8}	28	29	
9,17 ≤ N ≤ 9,70?			
x oui □ non			

Témoin eau (Nw)			log Nw
10^{-4}	237	245	7,38
7,15 ≤ Nw ≤ lg N-1,3?			
x oui □ non			

Vérifications de la méthodologie:

- N est compris entre $1,5 \times 10^9$ UFC/ml et $5,0 \times 10^9$ UFC/ml
- Nw est compris entre $1,4 \times 10^6$ UFC/ml et lg N-1,3
- Nv0 est compris entre 30 et 160 UFC/ml
- A, B et C sont égaux ou supérieurs à $0,5 \times Nv0$
- Le quotient des dénombrements moyens pondérés est compris entre 5 et 15

	Essais					
	0,5% 5 min		0,5% 10 min		0,5% 60 min	
10^0	56	50	11	7	0	0
10^{-1}	8	5	0	0	0	0
10^{-2}	0	0	0	0	0	0
10^{-3}	0	0	0	0	0	0
log Na	2,72		<2,15		<2,15	
log R = log Nw - log Na	4,66		>5,24		>5,24	

Légende :

- Vc = dénombrement par ml
 \bar{x} = moyenne de Vc1 et Vc2
N = nombre d'UFC/ml dans la suspension d'essai
Nv = nombre d'UFC/ml dans la suspension de validation
A = nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation des conditions expérimentales
B = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de la toxicité du neutralisant
C = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de l'inactivation par dilution-neutralisation
Na = nombre d'UFC/ml des survivants après essai
R = réduction (lg R = lg N0 - lg Na)

Suspension d'essai et essai

Suspension d'essai (N)			log N
10^{-7}	308	300	9,48
10^{-8}	31	30	
9,17 ≤ N ≤ 9,70?			
x oui □ non			

Témoin eau (Nw)			log Nw
10^{-4}	222	235	7,36
7,15 ≤ Nw ≤ lg N-1,3?			
x oui □ non			

Vérifications de la méthodologie:

- N est compris entre $1,5 \times 10^9$ UFC/ml et $5,0 \times 10^9$ UFC/ml
- Nw est compris entre $1,4 \times 10^6$ UFC/ml et lg N-1,3
- Nv0 est compris entre 30 et 160 UFC/ml
- A, B et C sont égaux ou supérieurs à $0,5 \times Nv0$
- Le quotient des dénombrements moyens pondérés est compris entre 5 et 15

	Essais					
	0,5% 5 min		0,5% 10 min		0,5% 60 min	
10^0	60	51	12	8	0	0
10^{-1}	9	10	1	0	0	0
10^{-2}	1	1	0	0	0	0
10^{-3}	0	0	0	0	0	0
log Na	2,74		<2,15		<2,15	
log R = log Nw - log Na	4,62		>5,21		>5,21	

Légende :

- Vc = dénombrement par ml
 \bar{x} = moyenne de Vc1 et Vc2
N = nombre d'UFC/ml dans la suspension d'essai
Nv = nombre d'UFC/ml dans la suspension de validation
A = nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation des conditions expérimentales
B = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de la toxicité du neutralisant
C = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de l'inactivation par dilution-neutralisation
Na = nombre d'UFC/ml des survivants après essai
R = réduction (lg R = lg N0 - lg Na)

Suspension d'essai et essai

Suspension d'essai (N)			log N
10^{-7}	290	288	9,46
10^{-8}	29	30	
9,17 ≤ N ≤ 9,70?			
x oui □ non			

Témoïn eau (Nw)			log Nw
10^{-4}	237	224	7,36
7,15 ≤ Nw ≤ lg N-1,3?			
x oui □ non			

Vérifications de la méthodologie:

- N est compris entre $1,5 \times 10^9$ UFC/ml et $5,0 \times 10^9$ UFC/ml
- Nw est compris entre $1,4 \times 10^6$ UFC/ml et lg N-1,3
- Nv0 est compris entre 30 et 160 UFC/ml
- A, B et C sont égaux ou supérieurs à $0,5 \times Nv0$
- Le quotient des dénombrements moyens pondérés est compris entre 5 et 15

	Essais					
	0,5% 5 min		0,5% 10 min		0,5% 60 min	
10^0	60	66	8	6	0	0
10^{-1}	12	6	0	0	0	0
10^{-2}	0	1	0	0	0	0
10^{-3}	0	0	0	0	0	0
log Na	2,80		<2,15		<2,15	
log R = log Nw - log Na	4,56		>5,22		>5,22	

Légende :

- Vc = dénombrement par ml
 \bar{x} = moyenne de Vc1 et Vc2
N = nombre d'UFC/ml dans la suspension d'essai
Nv = nombre d'UFC/ml dans la suspension de validation
A = nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation des conditions expérimentales
B = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de la toxicité du neutralisant
C = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de l'inactivation par dilution-neutralisation
Na = nombre d'UFC/ml des survivants après essai
R = réduction (lg R = lg N0 - lg Na)

ANNEXE TECHNIQUE

Milieux de culture utilisés, stérilisés par autoclavage :

TSA (Tryptone Soja agar), Dominique Dutscher, réf. 777410, lot n°409161

SUBSTANCES INTERFÉRENTES :

Sérum Albumine Bovine en poudre, Fraction V, Dominique Dutscher, réf.P6154, lot M10637P6154

Sang de mouton, Analytic Lab, réf. 08449, lot n°bcj3984V.

DILUANT

Solution Tryptone-Sel (TS)

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée :

- Tryptone, Dominique Dutscher, réf. 777472, lot n° 090633 -----1,00 g/l
- Chlorure de sodium, Grosseron, ref 9020401, lot n° FR08 085 793 -----8,50 g/l

pH final après autoclavage à 25°C : 7,0 ± 0,2

NEUTRALISANT

Ingrédients par litre d'eau distillée stérile :

- Polysorbate 80, Sigma Aldrich, ref 59924, lot BCBJ6978V----- 30g/l
- Jaune d'œuf, 5% ----- 50g/l

Stérilisé par autoclavage (sans jaune d'œuf)

EAU DURE

Solution A: - MgCl₂ anhydre, réf. M8266, lot n° 108K0068, SIGMA ALDRICH

- CaCl₂ anhydre, réf. C1016, lot n° 059K0030, SIGMA ALDRICH

Solution B: - NaHCO₃, réf. S6014, lot n°059K0052, SIGMA ALDRICH

pH final après filtration: 7,0 ± 0,2 à 25°C.

PORTE-GERMES EN VERRE – lames de verre dépoli 15 x 60 mm, 1 mm d'épaisseur – Thermo scientific/
Menzel-Gläser – réf. 100 OTM, lot n°01 1794389.

PROCES-VERBAL NORME EN 13624 : 2013**Laboratoire ayant réalisé l'essai**

Laboratoire d'Hygiène Hospitalière
Centre de Biologie 6ème étage,
CHU de Clermont-Ferrand
63003 CLERMONT-FERRAND
Tél. : 04.73.75.48.70

Client

Franklab
BP63
78185 Saint-Quentin en Yvelines

Identification de l'échantillon

Nom du produit : F010435V4
Fabricant : Franklab
Diluant du produit dont l'utilisation est recommandée par le fabricant : Eau potable
Substance(s) active(s) : Non spécifié
Date de livraison du produit : 2/5/14
Date de péremption : Non renseigné
Période d'analyse : Du 22/5/14 au 25/5/14

Résultats d'essai

EN : 13624 (Phase 2, étape 1)

Nom du produit : F010435V4
N° Lot : L372-25/4/14
Fabricant : Franklab
Aspect du produit : Liquide, Vert clair
Conditions de stockage (température, etc.) : Obscurité, température ambiante

Méthode par dilution-neutralisation:

Raisons du choix de la méthode : Méthode recommandée par la norme EN 13624
Neutralisant utilisé : Bouillon Lethen Réf VWR : 301580ZA
Température d'essai : 20°C
Substances interférentes : Conditions de saleté (BSA 3 g/L + GRm 3ml/L)
Souche d'essai : *Candida albicans* IP 48.72
Température d'incubation : 30°C
Date de l'essai : 22/5/14
Diluant utilisé pour les solutions d'essai du produit : Eau dure (Produit utilisé dilué)
Aspect des dilutions du produit: Liquide, Incolore
Aspect du produit lors de l'essai: Absence de précipité

Validation et témoins

Suspension de validation (N _{vo})			Témoin des conditions expérimentales (A)			Témoin de toxicité du neutralisant (B)			Validation de la méthode (C)		
V _{c1}	51	$\bar{x} = 55$	V _{c1}	45	$\bar{x} = 48$	V _{c1}	64	$\bar{x} = 62$	V _{c1}	39	$\bar{x} = 40$
V _{c2}	59		V _{c2}	51		V _{c2}	60		V _{c2}	41	
30 ≤ \bar{x} de N _{vo} ≤ 160 ?			\bar{x} de A est ≥ 0,5 × \bar{x} de N _{vo} ?			\bar{x} de B est ≥ 0,0005 × \bar{x} de N _{vo} ?			\bar{x} de C est ≥ 0,5 × \bar{x} de N _{vo} ?		
Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>			Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>			Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>			Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>		
Suspension de validation (N _{vB}), 10 ⁻³			V _{c1}	62	N _{vB} = 6,7.10 ⁴ N _{vB} est compris entre 3.10 ⁴ et 1,6.10 ⁵ Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>						
			V _{c2}	71							

V_c : Nombre d'UFC comptées/ml ; N : Nombre d'UFC dans la suspension d'essai ; N₀ : Nombre d'UFC dans le mélange d'essai ; N_a : Nombre d'UFC dénombrées après contact avec le produit ; N_{vo} : Nombre d'UFC/ml dans la dilution de la suspension de validation ; N_{vB} : Nombre d'UFC/ml dans la suspension de validation du témoin B ; R : Réduction du nombre de bactéries. Inc : Incomptable

Comme indiqué dans la norme, la concentration du produit utilisée pour valider la norme est la concentration la plus élevée étudiée soit ici 1%.

Suspension d'essai et Essai

Suspension d'essai (N et N ₀)	N	V _{c1}	V _{c2}	$N = (180 + 201 + 24 + 26) / 2,2 \times 10^{-5} = 7,29 \log$ $N_0 = N/10 = 6,29 \log$ N_0 est compris entre 6,17 et 6,70	Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
	10 ⁻⁵	180	201		
	10 ⁻⁶	24	26		

Conc. du produit et temps de contact	Facteur de dilution	V _{c1}	V _{c2}	N _a = $\bar{x} \times 10$	Log N _a	log R (N ₀ = 6,29)
1% 5 minutes	10 ⁰	0	0	<140	<2,15	>4,14
	10 ⁻¹	0	0			
0,5% 5 minutes	10 ⁰	0	0	<140	<2,15	>4,14
	10 ⁻¹	0	0			
0,25% 5 minutes	10 ⁰	0	0	<140	<2,15	>4,14
	10 ⁻¹	0	0			
0,125% 5 minutes	10 ⁰	1	1	<140	<2,15	>4,14
	10 ⁻¹	0	0			

V_c : Nombre d'UFC comptées/ml ; N : Nombre d'UFC dans la suspension d'essai ; N₀ : Nombre d'UFC dans le mélange d'essai ; N_a : Nombre d'UFC dénombrées après contact avec le produit ; N_{vo} : Nombre d'UFC/ml dans la dilution de la suspension de validation ; R : Réduction du nombre de bactéries. Inc : Incomptable

Contrôle des moyennes pondérées : D = [(180 + 201) / 2] / [(24 + 26) / 2] = 7,62
7,62 est compris entre 5 et 15.

Remarques à propos des résultats

- ✓ Tous les témoins et le mélange de validation de la méthode donnent des valeurs comprises à l'intérieur des limites de base.
- ✓ Une concentration du produit au moins a présenté une réduction logarithmique d'au moins 4 log.
- ✓ Aucune formation de précipité durant la réalisation de l'essai.
- ✓ Les concentrations d'essai testées n'ont pas permis de mettre en évidence de concentration non active.

Conclusion

Des tests ont été effectués sur la souche référencée *Candida albicans* IP 48.72. Les essais ont été effectués une fois. La réduction avec la souche d'essai *C. albicans* en 5 minutes à 0,125% est de $1,38 \cdot 10^4$ soit 4,14 log.

Conformément à la norme **EN 13624**, le lot **L372-25/4/14** du produit **F010435V4**, lorsqu'il est concentré à **0,125%** (V/V) dans de l'eau dure (Produit utilisé dilué), présente une activité **levuricide** en **5 minutes** à **20°C**, dans les **conditions de saleté (BSA 3g/L + GRm 3 ml/L)**, vis-à-vis de la souche référencée *Candida albicans*.

Clermont-Ferrand, le 6/6/14.

Pr. O. TRAORÉ



RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE LEVURICIDE DU
PRODUIT F010435V4 SELON LA NORME EN 14562**

Pour: **FRANKLAB**
3 AVENUE DES FRENES
78180 MONTIGNY-LE-BRETONNEUX



Demande d'essai du: 12/05/2015

Références du dossier d'analyses: n° n°140D10-2015-08

ESSAI DE LEVURICIDIE:

Selon la méthodologie de la norme européenne NF EN 14562 (Septembre 2006) – antiseptiques et désinfectants chimiques – essais quantitatifs de porte germes pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuride pour instruments utilisés en médecine humaine.

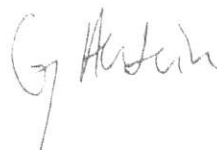
Essai sur une souche : *Candida albicans*.

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

Date d'émission : 24/06/2015

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

Professeur Georges HERBEIN
Professeur des Universités Médecin Hospitalier
Expert scientifique



SOMMAIRE

- LABORATOIRE AYANT REALISE LES ESSAIS
- IDENTIFICATION COMPLETE DE L'ECHANTILLON
- CONDITIONS EXPERIMENTALES
- VALIDATION DE LA METHODE ET RESULTATS PROPREMENT DITS
- CONCLUSIONS
- FEUILLES DE RESULTATS
- ANNEXE TECHNIQUE

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 BESANÇON
FRANCE

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

Echantillon	N° lot
F010435V4	L372-25/04/14B02

Echantillons reçus au laboratoire le 22/05/2015.

Date limite d'utilisation optimale: non précisé

Fabricant: FRANKLAB

Date de fabrication: non précisé

Conditions de stockage: Température ambiante et obscurité

Composants actifs: ammoniums quaternaires.

Aspect: liquide vert

Diluant préconisé par le fabricant: eau potable.

Période de l'étude: du 01/06/2015 au 08/06/2015

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Concentrations du produit soumis à l'essai : 0.5%
- Méthode employée: EN 14562
- Temps de contact: 5 min- 10 min et 60 min
- Température d'essai: 20°C
- Substance interférente: albumine bovine (3g/l) et érythrocytes de mouton (3 mL/L), conditions de saleté.
- Diluant des suspensions fongiques et des essais : solution tryptone sel stérile pour les dénombrements et neutralisant pour les essais.
- Souches utilisées : *Candida albicans* CIP 48.72 lot 265.09
- Conditions de culture: sur GEM (Gélose à l'Extrait de Malt), à 30°C ± 1°C.
- Technique d'arrêt de l'action levuricide: transfert du porte germe dans 10 ml de neutralisant à base de polysorbate 80, de saponine et de jaune d'œuf (composition en annexe).

18, rue Alain SAVARY • 25000 Besançon • Tel: 03.81.25.09.04 • Fax: 03.81.25.53.51 • SARL • RCS BESANÇON • N° SIRET 51786053200012 □ N° TVA intra FR 23517860532 • info@apexlabo.com

4. RESULTATS PROPUREMENT DITS

Voir feuilles de résultats.

SYNTHESE RESULTATS

Le produit **F010435V4** est bien actif vis-à-vis des souches de référence utilisées, car la réduction moyenne obtenue est supérieure à 4 log pour les cellules fongiques viables :

- Pour *C. albicans*, R > 4,17 à 0,5% de produit, 10 min de contact

5. CONCLUSION

Conformément à la norme EN 14562 (Septembre 2006), le produit F010435V4 lot n°L372-25/04/14B02:

- a une activité levuricide sur la souche de référence lorsqu'employé à 0,5%, pour 10 min de contact à 20°C, en conditions de saleté (3 g/l d'albumine bovine finaux + érythrocytes de mouton).



Suspension d'essai et essai

Suspension d'essai (N)			log N	N
10^{-6}	231	225	8,37	$2,34 \cdot 10^8$
10^{-7}	29	27		
$8,17 \leq \log N \leq 8,70?$ x oui <input type="checkbox"/> non				

Vérifications de la méthodologie:

- N est compris entre $1,5 \times 10^8$ UFC/ml et $5,0 \times 10^8$ UFC/ml
- Nw est compris entre $1,4 \times 10^6$ UFC/ml et $\lg N - 1,3$
- Nv0 est compris entre 30 et 160 UFC/ml
- A, B et C sont égaux ou supérieurs à $0,5 \times Nv0$
- Le quotient des dénombrements moyens pondérés est compris entre 5 et 15

Témoin eau (Nw)			log Nw
10^{-4}	215	227	6,34
$6,15 \leq Nw \leq \lg N - 1,3?$ x oui <input type="checkbox"/> non			

	Essais à 0,50%					
	5 min		10 min		60 min	
10^0	45	48	10	13	0	0
10^{-1}	4	4	1	1	0	0
10^{-2}	0	0	0	0	0	0
10^{-3}	0	0	0	0	0	0
log Na	2,67		<2,15		<2,15	
log R = log Nw - log Na	3,68		>4,20		>4,20	

Légende :

Vc = dénombrement par ml

 \bar{x} = moyenne de Vc1 et Vc2

N = nombre d'UFC/ml dans la suspension d'essai

Nv = nombre d'UFC/ml dans la suspension de validation

A = nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation des conditions expérimentales

B = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de la toxicité du neutralisant

C = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de l'inactivation par dilution-neutralisation

Na = nombre d'UFC/ml des survivants après essai

R = réduction ($\lg R = \lg Nw - \lg Na$)

Suspension d'essai et essai

Suspension d'essai (N)			log N	N
10 ⁻⁶	237	241	8,38	2,40.10 ⁸
10 ⁻⁷	24	26		
8,17 ≤ log N ≤ 8,70?				
x oui □ non				

Vérifications de la méthodologie:

- N est compris entre 1,5 x 10⁸ UFC/ml et 5,0 x 10⁸ UFC/ml
- Nw est compris entre 1,4 x 10⁶ UFC/ml et lg N-1,3
- Nv0 est compris entre 30 et 160 UFC/ml
- A, B et C sont égaux ou supérieurs à 0,5 x Nv0
- Le quotient des dénombrements moyens pondérés est compris entre 5 et 15

Témoin eau (Nw)			log Nw
10 ⁻⁴	212	213	6,33
6,15 ≤ Nw ≤ lg N-1,3?			
x oui □ non			

	Essais à 0,50%					
	5 min		10 min		60 min	
10 ⁰	44	48	15	16	0	0
10 ⁻¹	8	4	1	1	0	0
10 ⁻²	0	0	0	0	0	0
10 ⁻³	0	0	0	0	0	0
log Na	2,66		2,19		<2,15	
log R = log Nw - log Na	3,66		4,14		>4,18	

Légende :

- Vc = dénombrement par ml
- \bar{x} = moyenne de Vc1 et Vc2
- N = nombre d'UFC/ml dans la suspension d'essai
- Nv = nombre d'UFC/ml dans la suspension de validation
- A = nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation des conditions expérimentales
- B = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de la toxicité du neutralisant
- C = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de l'inactivation par dilution-neutralisation
- Na = nombre d'UFC/ml des survivants après essai
- R = réduction (lg R = lg Nw - lg Na)

ANNEXE TECHNIQUE**Milieux de culture utilisés, stérilisés par autoclavage :**

GEM (Gélose à l'extrait de Malt), Dominique DUTSCHER, réf. 777304, lot n°301031

SUBSTANCES INTERFÉRENTES :

Sérum Albumine Bovine en poudre, Fraction V, SIGMA ALDRICH, réf. 05479, lot STBB7838V

DILUANT

Solution Tryptone-Sel (TS)

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée :

- Tryptone, Laboratoires CONDA, réf. 1612, lot n° 091229 -----1,00 g/l
- Chlorure de sodium, MOLECULAR BIOLOGY, ref n° 19032391, lot n° 808211----8,50 g/l

pH final après autoclavage à 25°C : 7,0 ± 0,2

NEUTRALISANTIngrédients par litre d'eau distillée:

Polysorbate 80, SIGMA ALDRICH, réf. 59924, lot n° BCBJ6978V -----	30 g
Jaune d'œuf frais -----	50 ml
Saponine, Analytic Lab, réf. 84510, lot n° BCBL6449V -----	30 g
Tampon PBS 0,25 M, Dominique Dutscher, réf. 091591, lot n° 903711 -----	q.s.p 1 l

Stérilisé par filtration sur filtre 0,45 µm ; pH à 25°C : 7,4 ± 0,1

PORTE-GERMES EN VERRE – lames de verre dépoli 15 x 60 mm, 1 mm d'épaisseur – Thermo scientific/Menzel-Gläser – réf. 100 OTM, lot n°01 1794389.

EAU DURE

Solution A: - MgCl₂ anhydre, réf. M8266, lot n° 108K0068, SIGMA ALDRICH

- CaCl₂ anhydre, réf. C1016, lot n° 059K0030, SIGMA ALDRICH

Solution B: - NaHCO₃, réf. S6014, lot n°059K0052, SIGMA ALDRICH

pH final après filtration: 7,0 ± 0,2 à 25°C.

18, rue Alain SAVARY • 25000 Besançon • Tel: 03.81.25.09.04 • Fax: 03.81.25.53.51 • SARL • RCS BESANÇON • N° SIRET 51786053200012 □ N° TVA intra FR 23517860532 • info@apexlabo.com

RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE VIS-A-VIS DU
VIRUS DBV (MODELE HCV) DU PRODUIT F010435V4**

Délivré à : **MME CHAKCHOUK**

Pour : **FRANKLAB
3 AVENUE DES FRENES
78180 MONTIGNY-LE-BRETONNEUX**



Demande d'essai du: 12/04/2017

Références du dossier d'analyses: n°061D04-2017-15

ESSAIS DE VIRUCIDIE:

Selon la méthodologie de la norme européenne NF EN 14476+A1 (Octobre 2015) – antiseptiques et désinfectants chimiques – essais virucides quantitatifs de suspension pour les désinfectants et antiseptiques utilisés en médecine humaine.

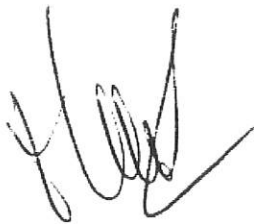
Essais sur le virus DBV (Diarrhée Bovine Virale), virus modèle de l'hépatite C, d'un échantillon de produit désinfectant, le produit F010435V4.

Ce rapport d'essai comporte 13 pages et ne concerne que les échantillons étudiés.

Date d'émission : 04/07/2017

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

Professeur Georges HERBEIN
Professeur des Universités Médecin Hospitalier
Expert scientifique



SOMMAIRE

1. LABORATOIRE AYANT REALISE LES ESSAIS
2. IDENTIFICATION COMPLETE DES ECHANTILLONS
3. CONDITIONS EXPERIMENTALES
4. VALIDATION DE LA METHODE
5. ESSAIS PROPUREMENT DITS – CALCUL DE L'ACTIVITE VIRUCIDE
6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE
7. CONCLUSIONS
8. ANNEXES TECHNIQUES

1 LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES ESSAIS

APEX BIOSOLUTIONS
4, rue des Grandes Pièces
25770 SERRE LES SAPINS
FRANCE

2 IDENTIFICATION COMPLETE DES ECHANTILLONS

F010435V4

Numéro de lot: n°5611
Date d'expiration: non précisé
Fabricant: FRANKLAB
Date de fabrication: non précisé
Conditions de stockage: selon les indications fournies par le fabricant
Composants actifs: ammoniums quaternaires
Aspect: liquide vert
Diluant préconisé par le fabricant: eau potable
Date de réception au laboratoire: 18/04/2017
Période de l'étude: 19/04/2017 au 30/06/2017

3 CONDITIONS EXPERIMENTALES

Température d'essai: 20°C ± 1°C
Méthode de titrage: virus titré en log DICT₅₀
Temps de contact: 5 min, 10 min et 60 min
Concentration cible: 0,5%
Diluant du produit utilisé lors des essais: eau dure
Souche de virus testée: virus DBV, cultivé sur cellules BT, à 37°C, sous 5% CO₂
Substance interférente: 3 g/l de sérum albumine bovine + 3 ml érythrocytes de mouton
Stabilité du produit en présence de substance interférente: bonne
Technique d'arrêt de l'action virucide: à froid

Titre viral :

Titrage par effet cytopathique de la suspension virale d'essai du virus DBV (calculé selon la méthode de Spearman-Kärber) = 7,00 log DICT₅₀.

4 VALIDATION DE LA METHODE

a) Méthodologie

Le produit F010435V4 a été testé sur des cultures de cellules BT et une faible cytotoxicité a été observée (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.

Dilution produit	Titre de virus (log DICT ₅₀)		
	Suspension virale sur cellules non traitées	Suspension virale sur cellules traitées	Différence de titre viral (log DICT ₅₀)
F010435V4 10 ⁻²	7,000	6,500	0,500

La différence de titre viral doit être inférieure à 1,0 log. Le produit F010435V4 testé à la concentration indiquée ci-dessus ne montre pas d'influence sur la méthode de titrage du virus DBV.

c) Validations de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit F010435V4:

Concentration du produit	Substances interférentes	Titre de virus (log DICT ₅₀)	Différence avec la suspension virale d'essai
F010435V4 0,5%	3 g/l de sérum albumine bovine + 3 ml érythrocytes de mouton	Essai 1: 7,125	0,125
		Essai 2: 7,125	0,125

La méthode est validée si la différence de titre viral est $\leq 0,5$ log.

d) Essai d'inactivation de référence

	Titre de virus (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral (log DICT ₅₀)
Suspension virale témoin	7,125	
En formaldéhyde 0,7%		
Essai d'inactivation 5 min	6,625	0,500
Essai d'inactivation 15 min	6,000	1,125
Essai d'inactivation 30 min	5,750	1,375

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. La réduction est de 1,375 log après 30 min et les conditions de la norme sont donc remplies.

5 ESSAIS PROPRESMENT DITS – CALCUL DE L'ACTIVITE VIRUCIDE

Essai 1

La suspension virale témoin a une concentration de $7,125 \log \text{DICT}_{50}$.

PRODUIT	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log DICT_{50})	Réduction du titre viral
F010435V4	0,5%	5 min	20°C	4,500	2,625
		10 min		3,000	4,125
		60 min		1,500	5,625

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

Essai 2

La suspension virale témoin a une concentration de $7,125 \log \text{DICT}_{50}$.

PRODUIT	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log DICT_{50})	Réduction du titre viral
F010435V4	0,5%	5 min	20°C	4,500	2,625
				2,750	4,375
		60 min		1,500	5,625

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

6 VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE

Les essais réalisés satisfont aux critères de validation car:

- 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 $7,0 \log \text{DICT}_{50}$ pour le virus DBV.
- 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; la différence est de 1,375 logs après 30 min d'inactivation par le formaldéhyde pour le virus DBV.
- Le produit testé n'affecte pas significativement la morphologie des cellules.
- Les conditions d'essai en saleté (3 g/l de sérum albumine bovine + 3 ml érythrocytes de mouton) n'affectent pas l'infectivité du virus
- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité des cellules au virus DBV. Les titres de virus mis en contact avec les cellules traitées avec le produit et les cellules non traitées ont une différence inférieure à 1,0 log (la différence est de 0,500 log).

- La différence de titre entre l'essai de suspension virale et le contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit F010435V4 est inférieure à 0,5 log (0,125 log DICT₅₀ essai 1 et 0,125 log DICT₅₀ essai 2)

7 CONCLUSION

Les essais réalisés sur le produit F010435V4 lot n° 5611 ont démontré:

- que le produit **F010435V4** employé à 0.5 %, a une activité virucide sur le virus DBV, (et donc par extension sur le virus de l'hépatite C) selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A1, pour 10 minutes de contact à 20°C, en conditions de saleté.



ANNEXE 1

Lignée cellulaire utilisée : cellules BT (ATCC réf. CRL-1390, lot n°58078520)

Souche virale: virus BVD (ATCC réf. VR-534, lot n°10W)

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

Réactifs:

- Sérum albumine bovine en poudre, Sigma Aldrich, réf. 05479, lot n° STBB7838V
- Erythrocytes de mouton, Oxoïd, réf. SR 0051E, lot n° 4234000

Solution d'inactivation:

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

EAU DURE

Solution A: - MgCl₂ anhydre, réf. M8266, lot n° 108K0068, SIGMA ALDRICH

- CaCl₂ anhydre, réf. C1016, lot n° 059K0030, SIGMA ALDRICH

Solution B: - NaHCO₃, réf. S6014, lot n°059K0052, SIGMA ALDRICH

pH final après filtration: 7,0 ± 0,2 à 25°C.

ANNEXE 2

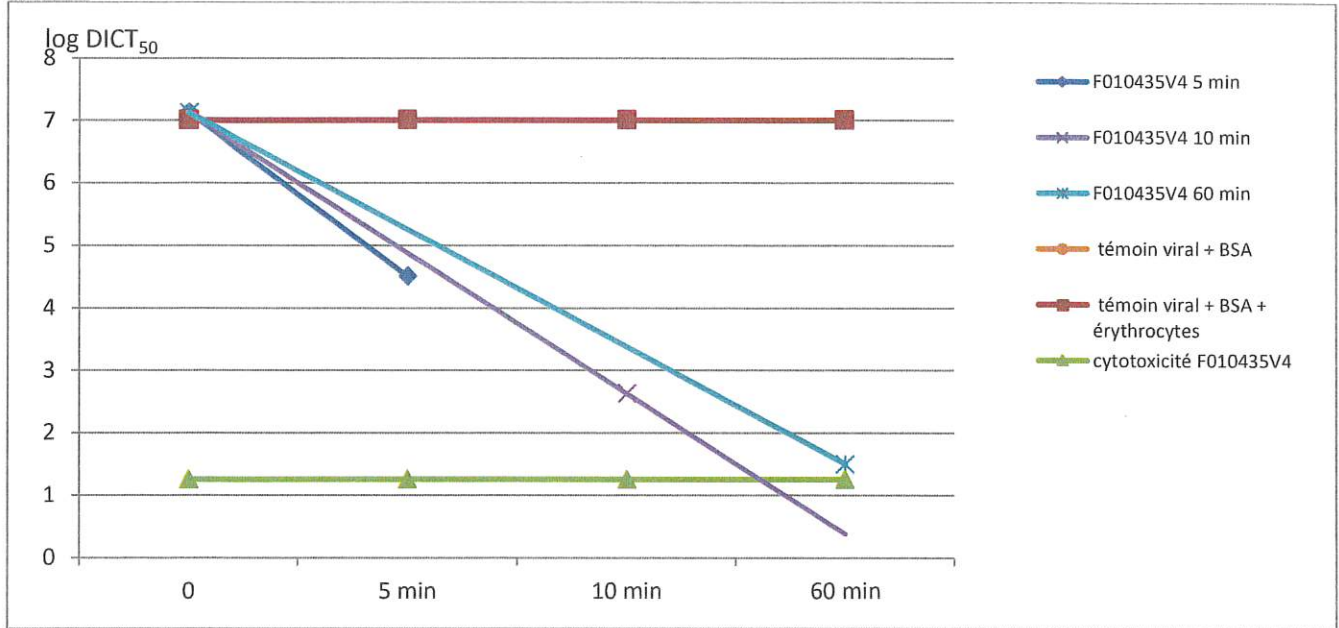
Tableau A1 - Titrage du virus DBV par effet cytopathique, par la méthode de calcul Spaerman-Kärber :

$\log \text{DICT}_{50} = 7,0$

Dilution (- log)	Résultat	% résultats positifs
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	44444444	100
-6	11112222	100
-7	10110100	50
-8	00000000	0
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Somme des % de cultures positives		450

Figure 1 – représentations graphiques des résultats des essais :

Essai 1



Essai 2

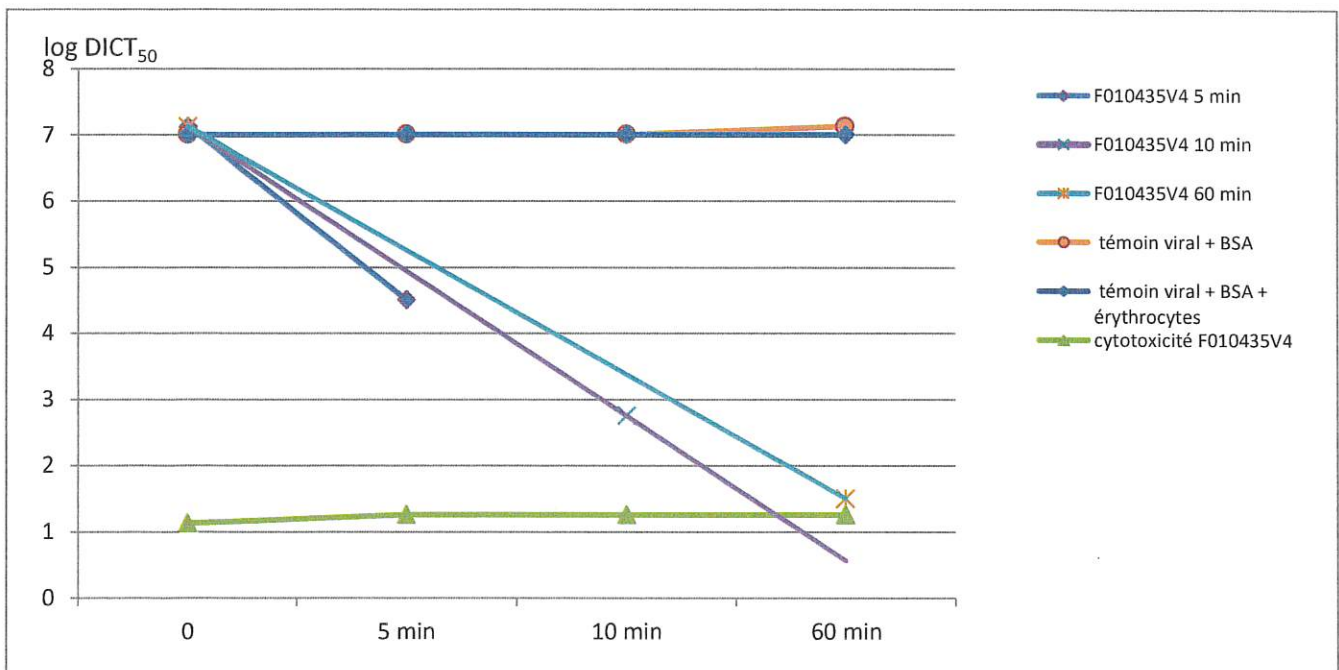


Tableau A2 — Tableau des résultats du produit F010435V4 et du virus DBV dans des conditions de saleté (3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes)

Produit	Concentration	Substance interférente	niveau de cytotoxicité	Lg DICT ₅₀					Réduction
				0	5 min	10 min	30 min	60 min	
F010435V4 essai 1	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	1,5	7,125	4,5	3	N.T.	1,5	R 10 min = 4,125
F010435V4 essai 2	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	1,5	7,125	4,5	2,75	N.T.	1,5	R 10 min = 4,375
Formaldéhyde	0,70%	PBS	2,375	7,125	6,625	6	5,75	N.T.	
contrôle d'infectivité essai 1	N.A.	PBS	N.A	7	N.T.	N.T.	N.T.	7	
	N.A.	3 g/l BSA	N.A	7	N.T.	N.T.	N.T.	7	
	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A	7	N.T.	N.T.	N.T.	7	
contrôle d'infectivité essai 2	N.A.	PBS	N.A	7	N.T.	N.T.	N.T.	7,125	
	N.A.	3 g/l BSA	N.A	7	N.T.	N.T.	N.T.	7	
	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A	7	N.T.	N.T.	N.T.	7	
sensibilité des cellules au virus	F010435V4	N.A.	cellules non traitées	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7	
	10 ⁻²	N.A.	cellules traitées	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,625	

Tableau A3 — Données brutes pour le produit F010435V4 avec 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes soumis à essai contre le virus DBV (titrage par effet cytopathique ; 8 puits)

Essai 1

	Concentration	substance interférente	temps de contact	Dilutions								
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	
F010435V4 essai 1	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	10 min	4444	4444	1000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
			contrôle vi- ral	4444	4444	4444	4444	4444	2111	1111	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	1000	0000	
		3 g/l BSA	10 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
contrôle viral	4444	4444	4444	4444	4444	2111	1111	0000				
	4444	4444	4444	4444	4444	1111	1000	0000				
F010435V4 essai 1 cytotoxicité	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A.	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
				4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
contrôle viral d'infectivité	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	1133	1221	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	3111	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1111	1111	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	3331	0000	0000	
	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	1112	2112	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	2311	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1112	1111	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1332	0000	0000	
	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	0	4444	4444	4444	4444	4444	1111	1111	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1121	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1113	1110	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1122	1000	0000	
Formaldéhyde	0,70%	PBS	5	4444	4444	4444	4444	4444	1122	1000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	2222	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	2332	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	2222	0000	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	4444	1221	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	1111	1100	0000	0000	
Formaldéhyde (cytotoxicité)	0,70%	PBS	N.A.	4444	1111	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	
				4444	1110	0000	0000					

Essai 2

	Concentration	substance interférente	temps de contact	Dilutions								
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	
F010435V4 2 essai	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	10 min	4444	4444	1100	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
			contrôle viral	4444	4444	4444	4444	4444	1333	1111	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	1000	0000	
		3 g/l BSA	10 min	4444	4444	1000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
contrôle viral	4444	4444	4444	4444	4444	1122	1111	0000				
	4444	4444	4444	4444	4444	2222	0000	0000				
F010435V4 essai 2 cytotoxicité	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A.	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
				4000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
contrôle viral d'infectivité	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	2211	1111	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	2211	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	2211	1111	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	2221	1000	0000	
	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	2111	1111	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1111	1111	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	0	4444	4444	4444	4444	4444	1111	1111	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1133	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	2112	1112	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
Formaldéhyde	0,70%	PBS	5	4444	4444	4444	4444	4444	2222	1000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1122	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	3331	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	4444	2221	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	1111	1100	0000	0000	
Formaldéhyde (cytotoxicité)	0,70%	PBS	N.A.	4444	1111	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	
				4444	1110	0000	0000					

Validations avec autres concentrations testées :

	Concentration	substance interférente	temps de contact	dilutions							
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
F010435V4	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	5 min	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000
			60 min	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000

	Concentration	substance interférente	temps de contact	Log TCID ₅₀		Réduction	
				0	t		
F010435V4	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	5 min	7,125	4,5	2,625	inactive
			60 min	7,125	1,5	5,625	active

Sensibilité des cellules au virus :

Produit	dilution	substance interférente		Dilutions						
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
F010435V4	10 ⁻²	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	Cellules non traitées	4444	4444	4444	2211	1111	1111	0000
				4444	4444	4444	2222	1111	0000	0000
			Cellules traitées	4444	4444	3222	1 111	1111	0000	0000
				4444	4444	2222	1111	1111	0000	0000

RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE VIS-A-VIS DU
VIRUS HIV DU PRODUIT F010435V4**

Délivré à : **MME CHAKCHOUK**

Pour : **FRANKLAB
3 AVENUE DES FRENES
78180 MONTIGNY-LE-BRETONNEUX**



Demande d'essai du: 12/04/2017

Références du dossier d'analyses: n°061D04-2017-13

ESSAIS DE VIRUCIDIE:

Selon la méthodologie de la norme européenne NF EN 14476+A1 (Octobre 2015) – antiseptiques et désinfectants chimiques – essais virucides quantitatifs de suspension pour les désinfectants et antiseptiques utilisés en médecine humaine.

Essais sur le virus HIV (Virus Immunodéficience Humaine), d'un échantillon de produit désinfectant, le produit F010435V4.

Ce rapport d'essai comporte 13 pages et ne concerne que les échantillons étudiés.

Date d'émission : 04/07/2017

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

Professeur Georges HERBEIN
Professeur des Universités Médecin Hospitalier
Expert scientifique



SOMMAIRE

1. LABORATOIRE AYANT REALISE LES ESSAIS
2. IDENTIFICATION COMPLETE DES ECHANTILLONS
3. CONDITIONS EXPERIMENTALES
4. VALIDATION DE LA METHODE
5. ESSAIS PROPREMENT DITS – CALCUL DE L'ACTIVITE VIRUCIDE
6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE
7. CONCLUSIONS
8. ANNEXES TECHNIQUES

1 LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES ESSAIS

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 BESANÇON
FRANCE

2 IDENTIFICATION COMPLETE DES ECHANTILLONS

F010435V4

Numéro de lot: n° 5611
Date d'expiration: non précisé
Fabricant: FRANKLAB
Date de fabrication: non précisé
Conditions de stockage: selon les indications fournies par le fabricant
Composants actifs: ammoniums quaternaires
Aspect: liquide vert
Diluant préconisé par le fabricant: eau potable
Date de réception au laboratoire: 18/04/2017
Période de l'étude: 19/04/2017 au 30/06/2017

3 CONDITIONS EXPERIMENTALES

Température d'essai: 20°C ± 1°C
Méthode de titrage: virus titré en log URL/mg (unité relative de lumière), par marquage du virus à la luciférase.
Le protocole a été adapté pour permettre la mesure du titre viral par mesure de l'activité luciférase, du fait de l'effet cytopathique très discret et difficile à lire du VIH.
Temps de contact: 5 minutes, 10 minutes et 60 min
Concentration cible: 0,5%
Diluant du produit utilisé lors des essais: eau dure
Souche de virus testée: VIH-1 souche pNL4-3Luc, cultivé sur cellules lymphoïdes 1G5, à 37°C, sous 5% CO2
Substance interférente: 3 g/l de sérum albumine bovine + 3 ml érythrocytes de mouton
Stabilité du produit en présence de substance interférente: bonne
Technique d'arrêt de l'action virucide: à froid

Titre viral :

Titrage par effet cytopathique de la suspension virale d'essai du virus HIV (calculé selon la méthode de Spearman-Kärber) = 6,50 log URL/mg.

4, rue des Grandes Pièces - 25770 SERRE LES SAPINS ■ Tel: 06.81.30.94.66 ■ SARL au capital de 10 000 € ■ RCS BESANÇON
■ N° SIRET 51786053200012 ■ N° TVA intra FR 23517860532 ■ info@apexlabo.com

4 VALIDATION DE LA METHODE

a) Méthodologie

Le produit F010435V4 a été testé sur des cultures de cellules 1G5 et une faible cytotoxicité a été observée (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.

Dilution produit	Titre de virus (log URL/mg)		
	Suspension virale sur cellules non traitées	Suspension virale sur cellules traitées	Différence de titre viral (log URL/mg)
F010435V4 10^{-1}	6,500	6,125	0,375

La différence de titre viral doit être inférieure à 1,0 log. Le produit F010435V4 testé à la concentration indiquée ci-dessus ne montre pas d'influence sur la méthode de titrage du virus HIV.

c) Validations de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit F010435V4:

Concentration du produit	Substances interférentes	Titre de virus (log URL/mg)	Différence avec la suspension virale d'essai
F010435V4 0,5%	3 g/l de sérum albumine bovine + 3 ml érythrocytes de mouton	Essai 1: 6,500	0,000
		Essai 2: 6,500	0,000

La méthode est validée si la différence de titre viral est $\leq 0,5$ log.

d) Essai d'inactivation de référence

	Titre de virus (log URL/mg)	Réduction du titre viral (log URL/mg)
Suspension virale témoin	6,500	
En formaldéhyde 0,7%		
Essai d'inactivation 5 min	6,000	0,500
Essai d'inactivation 15 min	5,500	1,000
Essai d'inactivation 30 min	5,125	1,375

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. La réduction est de 1,375 log après 30 min et les conditions de la norme sont donc remplies.

5 ESSAIS PROPRESMENT DITS – CALCUL DE L'ACTIVITE VIRUCIDE

Essai 1

La suspension virale témoin a une concentration de 6,500 log URL/mg.

PRODUIT	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log URL/mg)	Réduction du titre viral
F010435V4	0,5%	5 min	20°C	4,500	2,000
		10 min		2,250	4,250
		60 min		1,000	5,500

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

Essai 2

La suspension virale témoin a une concentration de 6,500 log URL/mg.

PRODUIT	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log URL/mg)	Réduction du titre viral
F010435V4	0,5%	5 min	20°C	4,500	2,000
		10 min		2,000	4,500
		60 min		1,000	5,500

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

6 VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE

Les essais réalisés satisfont aux critères de validation car:

- 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 6,500 log URL/mg pour le virus HIV.
- 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; la différence est de 1,375 log après 30 min d'inactivation par le formaldéhyde pour le virus HIV.
- Le produit testé n'affecte pas significativement la morphologie des cellules.
- Les conditions d'essai en saleté (3 g/l de sérum albumine bovine + 3 ml érythrocytes de mouton) n'affectent pas l'infectivité du virus
- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité des cellules au virus HIV. Les titres de virus mis en contact avec les cellules traitées avec le produit et les cellules non traitées ont une différence inférieure à 1,0 log (la différence est de 0,375 log).

- La différence de titre entre l'essai de suspension virale et le contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit F010435V4 est inférieure à 0,5 log (0,0 log URL/mg essai 1 et 0,0 log URL/mg essai 2)

7 CONCLUSION

Les essais réalisés sur le produit F010435V4 lot n° 5611 ont démontré:

- que le produit **F010435V4** employé à 0.5 %, a une activité virucide sur le virus HIV, selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A1, pour 10 minutes de contact à 20°C, en conditions de saleté.



ANNEXE 1

Lignée cellulaire utilisée : cellules 1G5, ATCC, USA

Souche virale: VIH-1 (pNL4-3Luc), NIH, Bethesda, MA, USA

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

Réactifs:

- Sérum albumine bovine en poudre, Sigma Aldrich, réf. 05479, lot n° STBB7838V
- Erythrocytes de mouton, Oxoïd, réf. SR 0051E, lot n° 4234000

Solution d'inactivation:

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

EAU DURE

Solution A: - MgCl₂ anhydre, réf. M8266, lot n° 108K0068, SIGMA ALDRICH

- CaCl₂ anhydre, réf. C1016, lot n° 059K0030, SIGMA ALDRICH

Solution B: - NaHCO₃, réf. S6014, lot n°059K0052, SIGMA ALDRICH

pH final après filtration: 7,0 ± 0,2 à 25°C.

ANNEXE 2

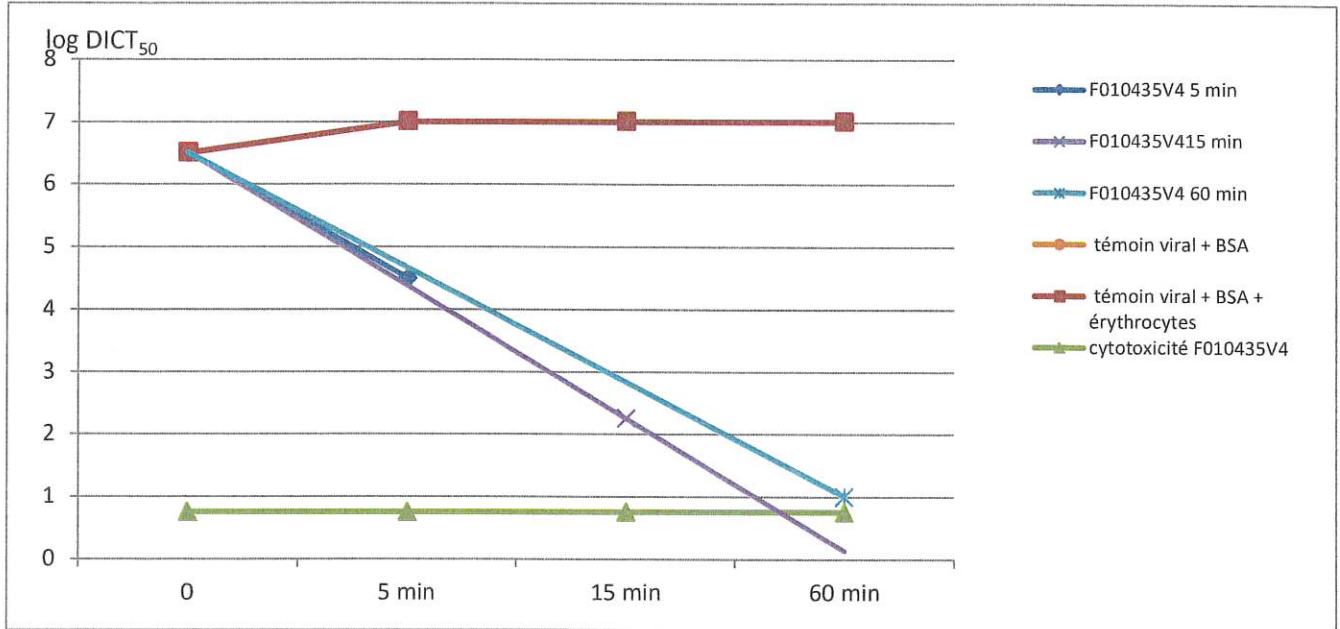
Tableau A1 - Titrage du virus HIV par effet cytopathique, par la méthode de calcul Spaerman-Kärber :

log URL/mg = 6,500

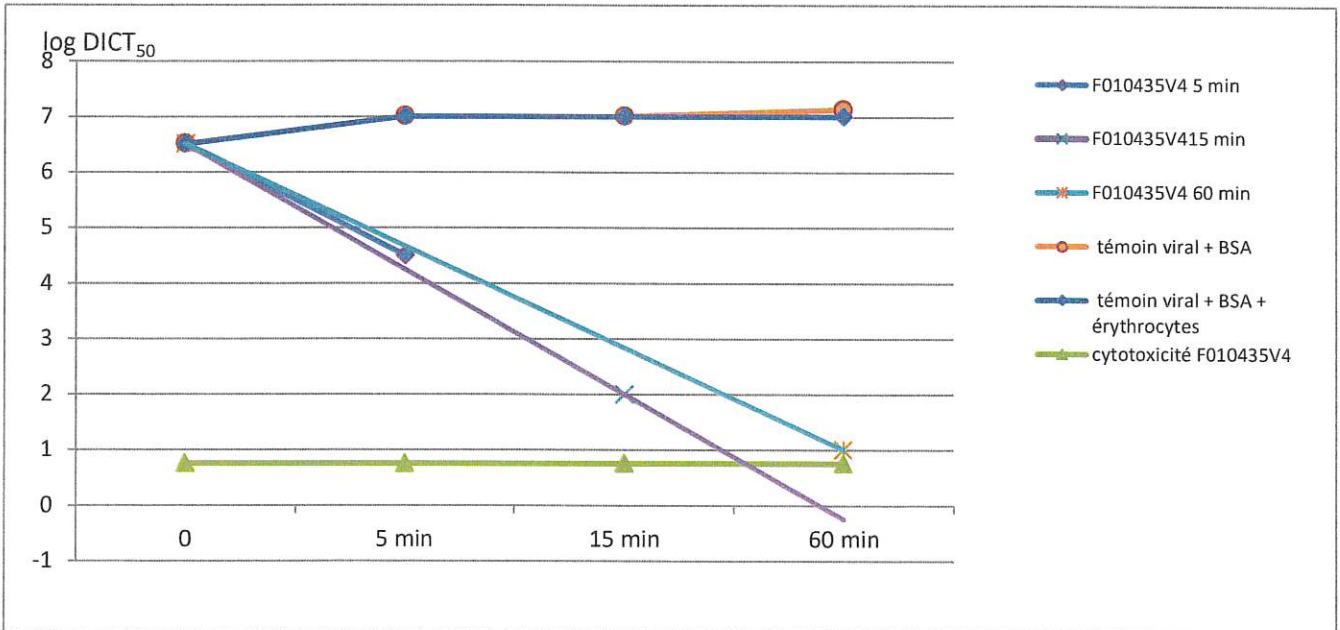
Dilution (- log)	Résultat	% résultats positifs
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	44444444	100
-6	11111111	100
-7	00000000	0
-8	00000000	0
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Somme des % de cultures positives		400

Figure 1 – représentations graphiques des résultats des essais :

Essai 1



Essai 2



F_{010435V4} - EN14476 - 01.22

Tableau A2 — Tableau des résultats du produit F010435V4 et du virus HIV dans des conditions de saleté (3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes)

Produit	Concentration	Substance interférente	niveau de cytotoxicité	Lg URL/mg					Réduction
				0	5 min	10 min	30 min	60 min	
F010435V4 essai 1	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	0,75	6,5	4,5	2,25	N.T.	1	R 15 min = 4,25
F010435V4 essai 2	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	0,75	6,5	4,5	2	N.T.	1	R 15 min = 4,50
Formaldéhyde	0,70%	PBS	2,375	6,5	6	5,5	5,125	N.T.	
contrôle d'infectivité essai 1	N.A.	PBS	N.A	6,5	N.T.	N.T.	N.T.	7	
	N.A.	3 g/l BSA	N.A	7	N.T.	N.T.	N.T.	7	
	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A	6,5	N.T.	N.T.	N.T.	7	
contrôle d'infectivité essai 2	N.A.	PBS	N.A	6,5	N.T.	N.T.	N.T.	7,125	
	N.A.	3 g/l BSA	N.A	6,5	N.T.	N.T.	N.T.	7	
	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A	6,5	N.T.	N.T.	N.T.	7	
sensibilité des cellules au virus	F010435V4	N.A.	cellules non traitées	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7	
	10 ⁻¹	N.A.	cellules traitées	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,625	

Tableau A3 — Données brutes pour le produit F010435V4 avec 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes soumis à essai contre le virus HIV (titrage par effet cytopathique ; 8 puits)

Essai 1

	Concentration	substance interférente	temps de contact	Dilutions								
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	
F010435V4 essai 1	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	10 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
			contrôle vi- ral	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
		3 g/l BSA	10 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
contrôle viral	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000				
	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000				
F010435V4 essai 1 cytotoxicité	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A.	4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
				0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
contrôle viral d'infectivité	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml éry- throcytes	0	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
Formaldéhyde	0,70%		5	4444	4444	4444	4444	1111	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	1000	0000	0000	0000	
Formaldéhyde (cytotoxicité)	0,70%		N.A.	4444	1111	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	
				4444	1100	0000	0000					

Essai 2

	Concentration	substance interférente	temps de contact	Dilutions								
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	
F010435V4 essai 2	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	10 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
			contrôle viral	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
		3 g/l BSA	10 min	4444	4440	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
			contrôle viral	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
F010435V4 essai 2 cytotoxicité	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A.	4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
contrôle viral d'infectivité	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	0	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
Formaldéhyde	0,70%	PBS	5	4444	4444	4444	4444	1111	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	
Formaldéhyde (cytotoxicité)	0,70%	PBS	N.A.	4444	1111	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	
				4444	0000	0000	0000					

Validations avec autres concentrations testées :

	Concentration	substance interférente	temps de contact	dilutions							
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
F010435V4	0,5%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	5 min	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	0000
			60 min	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000

	Concentration	substance interférente	temps de contact	Log U		Réduction	
				0	5 min		
F010435V4	0,5%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	5 min	6,5	4,5	2	inactive
			60 min	6,5	1	5,5	active

Sensibilité des cellules au virus :

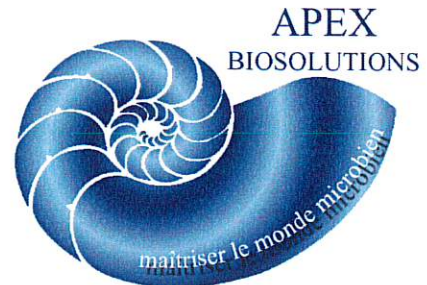
Produit	dilution	substance interférente		Dilutions							
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	
F010435V4	10 ⁻¹	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	Cellules non traitées	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
			Cellules traitées	4444	4444	4444	4 444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	1000	0000	0000	

RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE DU PRODUIT
F010435V4 SELON LA NORME EN 17111 :2018**

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du : 11/05/2020

Références du dossier d'analyses : n°090D27-2020-03

TESTS VIRUCIDES :

Conformément à la norme NF EN 17111 (Octobre 2018) – Désinfectants chimiques et antiseptiques — Essai quantitatif de porte-germe pour l'évaluation de l'activité virucide pour instruments utilisés en médecine — Méthode d'essai et exigences (phase 2, étape 2)

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

Ce rapport inclus 12 pages.

Date d'édition : 15/06/2020

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



SOMMAIRE

1. LABORATOIRE AYANT REALISE LES ESSAIS 3

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS 3

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES 3

4. VALIDATION DE LA METHODE 4



5. ESSAIS PROPRESMENT DITS – CALCUL DE L’ACTIVITE VIRUCIDE..... 5

6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE 5

7. CONCLUSION 6

8. ANNEXE 1 7

9. ANNEXE 2 8

Writer	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Ms Stephanie MOROT-BIZOT, director
	

1. LABORATOIRE AYANT REALISE LES ESSAIS

APEX BIOSOLUTIONS
 4, rue des Grandes Pièces
 Zone EURESPACE
 25 770 SERRE LES SAPINS
 FRANCE

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

ECHANTILLON	LOT N°
F010435V4	6451

Date limite d'utilisation optimale : non communiquée

Fabricant : FRANKLAB

Date de fabrication : non communiquée

Conditions de stockage : Température ambiante et obscurité.

Substances actives : ammonium quaternaire

Aspect : liquide vert

Diluant préconisé par le fabricant : eau potable

Date de réception au laboratoire : 28/05/2020



Période de l'étude : du 12/05/2020 au 15/06/2020

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Température d'essai: 20°C ± 1°C
- Méthode de titrage: log DICT₅₀
- Temps de contact : 5 min, 10 min et 15 min
- Concentrations finales: 0,5%
- 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
- Stabilité du produit en présence de substance interférente : bonne
- Technique d'arrêt de l'action virucide : à froid

Titre viral :

Titrage par effet cytopathique du virus de la vaccine (calculé selon la méthode de Spearman-Kärber) : 6,375
 log DICT₅₀

Writer	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Ms Stephanie MOROT-BIZOT, director
	

4. VALIDATION DE LA METHODE

a) Cytotoxicité

Les cellules BHK-21 ont été exposées au produit F010435V4 et une faible toxicité a été observée 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.

VACCINIA VIRUS	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)
F010435V4	10 ⁻²	6,250	5,875	0,375

Le produit testé à la concentration indiquée ci-dessus ne montre pas d'influence notable sur la méthode de titrage du virus de la vaccine (différence <1 log).



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

Concentration du produit	Substances interférentes	Titre de virus (log DICT ₅₀)	Différence avec la suspension virale d'essai	
F010435V4	0,5%	3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	Essai 1: 6,375	0,000
			Essai 2: 6,375	0,000

d) Essai d'inactivation de référence

	Titre de virus (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral (log DICT ₅₀)
Suspension virale témoin eau	6,125	
En glutardialdéhyde 200 ppm		
Essai d'inactivation 5 min	1,750	4,375

La validation des essais est effective si la réduction du titre viral entre la suspension témoin et la suspension soumise au glutardialdéhyde est comprise ≥ 4 log après 5 min. La réduction est de 4,375 log après 5 min et les conditions de la norme sont donc remplies.

Writer	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Ms Stephanie MOROT-BIZOT, director
	

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

Essai 1 – séchage 50 min

La suspension virale témoin eau a une concentration de **6,125 log DICT₅₀**.

PRODUIT	Concentration	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral
F010435V4	0,5%	15 min	20°C	1,750	4,375
		10 min		2,000	4,125
		5 min		3,000	3,125

Essai 2 – séchage 51 min

La suspension virale témoin eau a une concentration de **6,250 log DICT₅₀**.



PRODUIT	Concentration	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral
F010435V4	0,5%	15 min	20°C	1,750	4,500
		10 min		2,250	4,000
		5 min		3,125	3,125

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

6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE

Les essais ont été validés selon la norme européenne EN 17111 :2018:



- 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 6,375 log DICT₅₀ pour le virus de la vaccine.
- La différence des titres entre témoin viral et virus de référence dans l'essai d'inactivation est > 4 log : la différence est de 4,375 log après 5 min d'inactivation par le glutardialdéhyde pour le virus de la vaccine.
- Le produit testé n'affecte pas significativement la morphologie des cellules.
- Les conditions d'essai en saleté (3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton) n'affectent pas l'infectivité du virus de la vaccine.
- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité des cellules au virus de la vaccine. Les titres de virus mis en contact avec les cellules traitées avec le produit et les cellules non traitées ont une différence inférieure à 1,0 log (la différence est de 0,375 log).

Writer	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Ms Stephanie MOROT-BIZOT, director
	

7. CONCLUSION

Les essais réalisés sur le produit F010435V4 lot n°6451 ont démontré :

- Que le produit F010435V4, **employé dès 0,5% a une activité virucide sur le virus de la vaccine**, selon la méthodologie de la norme NF EN 17111 :2018, **pour 10 minutes de contact à 20°C, en conditions de saleté.**

Writer	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Ms Stephanie MOROT-BIZOT, director
	

8. ANNEXE 1

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

Solution d'inactivation :

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

PORTE-GERMES EN VERRE – lames de verre dépoli 15 x 60 mm, 1 mm d'épaisseur – Thermo scientific/ Menzel-Gläser – réf. 100 OTM, lot n°01 1794389.

Writer	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Ms Stephanie MOROT-BIZOT, director
	

9. ANNEXE 2

Table A1 – Titrage du virus de la vaccine par effet cytopathique, par la méthode de calcul Spaerman-Kärber :

Log DICT₅₀ = 6,375

Dilution (- log)	Résultat	% résultats positifs
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	44444444	100
-6	44444440	87,5
-7	00000000	0
-8	00000000	0
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Somme des % de cultures positives		387,5



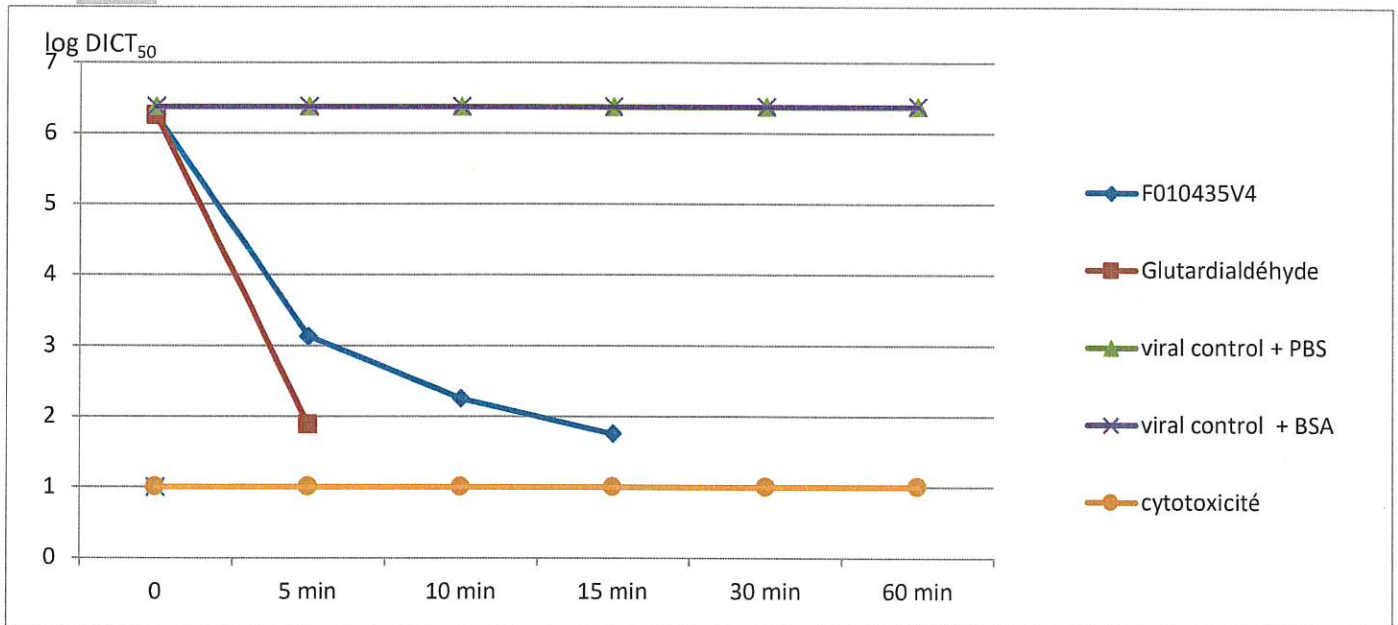
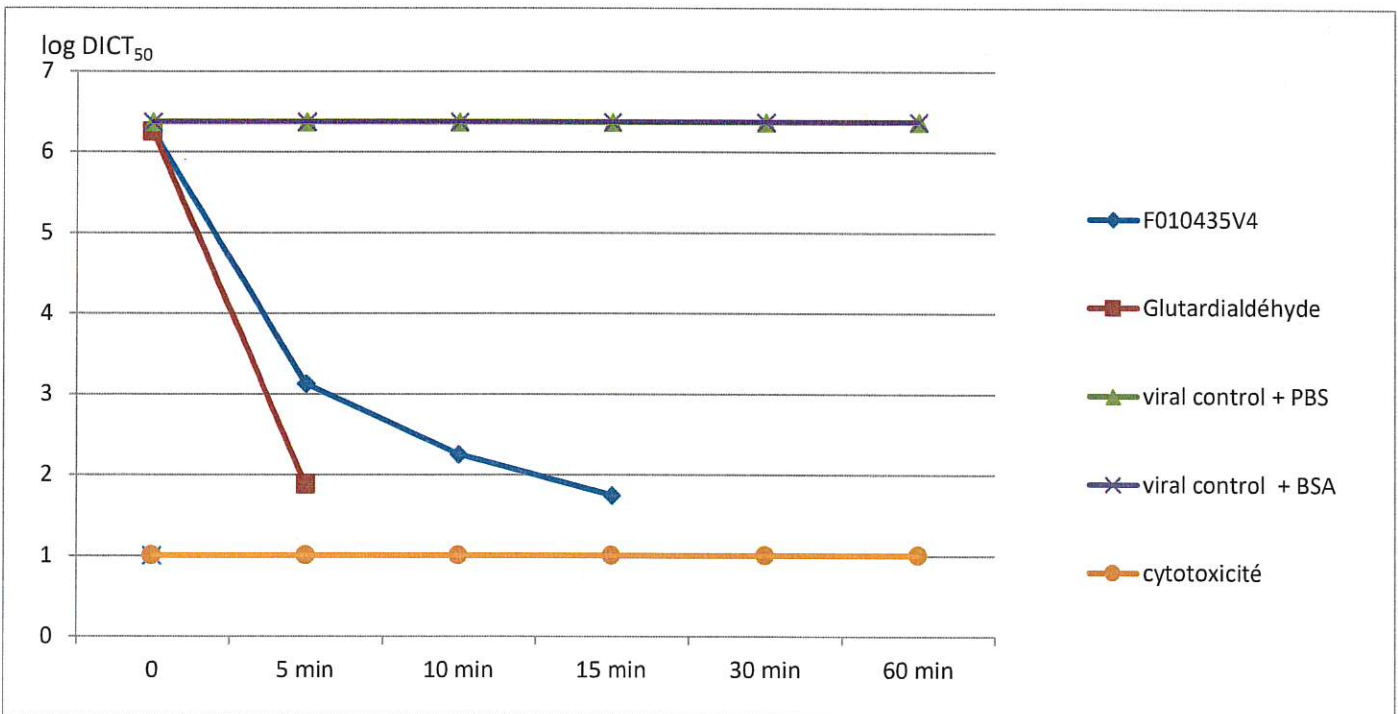
Writer	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Ms Stephanie MOROT-BIZOT, director
	

Figure 1 – représentations graphiques des résultats des essais :

Essai 1



Essai 2





Writer	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Ms Stephanie MOROT-BIZOT, director
	

Tableau A2 — Tableau de résultats du produit F010435V4 soumis à essai contre le virus de la vaccine en conditions de saleté

PRODUIT	Concentration	Substance interférente	Niveau de cytotoxicité	Lg TCID ₅₀						Réduction	
				0	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min		
F010435V4 ESSAI 1	0,50%	3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	1,250	6,125	3,000	2,000	1,750	N.T.	N.T.	10 min R = 4,125	
F010435V4 ESSAI 2	0,50%	3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	1,000	6,250	3,125	2,250	1,750	N.T.	N.T.	10 min R = 4,000	
Glutardialdéhyde ESSAI 1	100 ppm	PBS	1,875	6,125	1,750	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.		
Glutardialdéhyde ESSAI 2	100 ppm	PBS	2,000	6,250	1,875	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.		
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 1	N.A.	PBS	N.A.	6,125	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,125		
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 1	N.A.	3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	N.A.	6,125	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,125		
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 2	N.A.	PBS	N.A.	6,375	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,375		
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 2	N.A.	3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	N.A.	6,375	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,375		
Sensibilité des cellules au virus	10 ⁻²	N.A.	Cellules non traitées	6,250							
		N.A.	Cellules traitées	5,875							





Writer	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Ms Stephanie MOROT-BIZOT, director
	

Tableau A3 — Données brutes du produit F010435V4 soumis à essai contre le virus de la vaccine, en conditions de saleté (titrage par effet cytopathique; 8 puits).

ESSAI 1

	Concentration	Substance interférente	Temps de contact	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	
F010435V4 ESSAI 1	0,50%	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	15 min	4444	4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			10 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
	4444	0000		0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
Témoin eau	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4000	0000	0000	0000	0000	
F010435V4 cytotoxicité	0,50%	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	N.A.	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Glutardialdéhyde	100 ppm	PBS	5	4444	4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Glutardialdéhyde (cytotoxicité)	100 ppm	PBS	N.A.	4444	4400	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	
				4444	0000	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	
Contrôle viral d'infectivité	N.A.	3 g/L BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4000	0000	0000	0000	
60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4000	0000	0000	0000	0000		
Contrôle viral d'infectivité	N.A.	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4000	0000	0000	0000	
60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4000	0000	0000	0000	0000		



Writer	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Ms Stephanie MOROT-BIZOT, director
	

ESSAI 2

	Concentration	Substance interférente	Temps de contact	Dilutions								
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9
F010435V4 ESSAI 2	0,50%	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	15 min	4444 4444	4400 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			10 min	4444 4444	4444 4400	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			5 min	4444 4444	4444 4444	4444 4400	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			Témoin eau	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4400	0000 0000	0000 0000	0000 0000
F010435V4 cytotoxicité	0,50%	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	N.A.	4444 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	
Glutardialdéhyde	100 ppm	PBS	5	4444 4444	4440 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	
Glutardialdéhyde (cytotoxicité)	100 ppm	PBS	N.A.	4444 4444	4440 0000	0000 0000	0000 0000	N.T. N.T.	N.T. N.T.	N.T. N.T.	N.T. N.T.	
Contrôle viral d'infectivité	N.A.	3 g/L BSA	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4400	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4400	0000 0000	0000 0000	0000 0000	
Contrôle viral d'infectivité	N.A.	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	0	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4400	0000 0000	0000 0000	0000 0000
			60	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4400	0000 0000	0000 0000	0000 0000	

Sensibilité des cellules au virus :

PRODUIT	Dilution	Substance interférente		Dilutions								
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	
F010435V4	10 ⁻²	3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	Cellules non traitées	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4400	0000 0000	0000 0000	0000 0000	
			Cellules traitées	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 0000	0000 0000	0000 0000		

Writer	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Ms Stephanie MOROT-BIZOT, director
	

RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE TUBERCULOCIDE DU PRODUIT F010435V4
SELON LA NORME EN 14348**

A l'attention de Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du : 12/02/2018

Références du dossier d'analyses : n°241D17-2017-11

ESSAIS DE MYCOBACTERICIDIE :

Selon la méthodologie de la norme européenne NF EN 14348 (Juin 2005) – antiseptiques et désinfectants chimiques – essais quantitatifs de suspension pour l'évaluation de l'activité mycobactéricide des désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine, y compris les désinfectants pour instruments.

Essais sur 1 souche de référence : *Mycobacterium terrae*.

Ce rapport d'essai comporte 9 pages et ne concerne que l'échantillon étudié.

Date d'émission : 10/07/2018

Stéphanie MOROT-BIZOT

Docteur en microbiologie
Chargée de l'étude

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'S. Morot-Bizot', written in a cursive style.

SOMMAIRE

- LABORATOIRE AYANT REALISE LES ESSAIS
- IDENTIFICATION COMPLETE DE L'ECHANTILLON
- CONDITIONS EXPERIMENTALES
- VALIDATION DE LA METHODE ET RESULTATS PROPREMENT DITS
- CONCLUSIONS
- FEUILLES DE RESULTATS
- ANNEXE TECHNIQUE

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES ESSAIS

APEX BIOSOLUTIONS
4, rue des Grandes Pièces
25770 SERRE LES SAPINS
FRANCE

2. IDENTIFICATION COMPLETE DES ECHANTILLONS

Echantillon	N° lot
F010435V4	5203B03

- Date d'expiration : non précisé
- Fabricant : FRANKLAB
- Date de fabrication : non précisé
- Conditions de stockage : selon les indications fournies par le fabricant
- Composants actifs : ammoniums quaternaires
- Aspect : liquide vert
- Diluant préconisé par le fabricant : eau potable
- Date de réception au laboratoire : 11/04/2018
- Période de l'étude : 20/05/2018 au 25/06/2018

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Concentrations du produit soumis à l'essai : 2% - 5% -10%.
- Apparence du produit et de ses dilutions : limpide.
- Méthode employée: dilution-neutralisation.
- Temps de contact : 5 minutes, 10 minutes et 60 minutes.
- Température d'essai: 20°C ± 1°C.
- Substances interférentes : en conditions de saleté, sérum albumine bovine 3 g/L + érythrocytes de mouton 3 mL/L.
- Diluant du produit utilisé lors des essais : eau distillée.
- Souches de mycobactéries utilisées: *Mycobacterium terrae* CIP 104321, lot n°16308 (Institut Pasteur).
- Conditions de culture: bouillon Middlebrook 7H9 ADC 10%, milieu Middlebrook 7H10 OADC 10%, à 37°C ± 1°C.
- Stabilité du produit en présence de substance interférente : bonne.
- Mode opératoire : par dilution-neutralisation, avec neutralisant à base de thiosulfate de sodium (2 %).

4, rue des Grandes Pièces, zone Eurespace, 25 770 SERRE LES SAPINS ▪ Tel: 09.62.52.91.87 ▪ SARL au capital de 10 000 € ▪ RCS BESANÇON ▪ N° SIRET 51786053200012 ▪ N° TVA intra FR 23517860532 ▪ info@apexlabo.com

4. VALIDATION DE LA METHODE ET RESULTATS PROPREMENT DITS

Voir feuilles de résultats.

Le produit F010435V4 est bien actif vis-à-vis des souches de référence utilisées, car la réduction obtenue est supérieure à 4 log:

En conditions de saleté (moyenne des répétitions):

- pour *Mycobacterium terrae*, R = 5,24 à la concentration de 5% et pour 10 min de contact

5. CONCLUSIONS

Conformément à la norme EN 14348 (Juin 2005), le produit F010435V4 :

- présente une activité tuberculocide vis-à-vis de la souche *Mycobacterium terrae* en 10 min à 20°C, dans les conditions de saleté, lorsqu'employé à 5%

FEUILLE 1 DE RESULTATS DES ESSAIS SUR *Mycobacterium terrae*

Norme employée: EN 14348, phase 2, étape 1

Nom du produit : F010435V4

N° de lot: 5203B03

Nombre de boîtes : 2 boîtes / ml (2 ml au total)

Neutralisant : thiosulfate de sodium (2%).

Température d'essai : 20°C

Substances interférentes : albumine bovine 0,3 g/l

Souche d'essai : *Mycobacterium terrae* CIP 104321

Date des essais : 05/06/2018

Personne responsable : Stephanie MOROT-BIZOT

Signature :


Validation et contrôles

	Suspension de validation Nv0		Témoin des conditions expérimentales A		Témoin du neutralisant B		Validation de la méthode C	
Vc1	68	\bar{x}	70	\bar{x}	64	\bar{x}	50	\bar{x}
Vc2	64	66	80	75	68	66	51	50,5
	30 ≤ \bar{x} de Nv0 ≤ 160 x oui <input type="checkbox"/> non		\bar{x} de A est ≥ 0,5 × \bar{x} de Nv0 x oui <input type="checkbox"/> non		\bar{x} de B ≥ 0,5 × \bar{x} de Nv0 x oui <input type="checkbox"/> non		\bar{x} de C ≥ 0,5 × \bar{x} de Nv0 x oui <input type="checkbox"/> non	

Suspension d'essai et essai

Suspension d'essai (N)			log N	log N0
10 ⁻⁷	238	193	9,34	8,34
10 ⁻⁸	24	18		
8,17 ≤ log N0 ≤ 8,70? x oui <input type="checkbox"/> non				

Vérifications de la méthodologie:

- N est compris entre $1,5 \times 10^9$ UFC/ml et $5,0 \times 10^9$ UFC/ml
- N0 est compris entre $1,5 \times 10^8$ UFC/ml et $5,0 \times 10^8$ UFC/ml
- Nv0 est compris entre 30 et 160 UFC/ml
- Nv est compris entre 3×10^2 UFC/ml et $1,6 \times 10^3$ UFC/ml
- A, B et C sont égaux ou supérieurs à $0,5 \times Nv0$
- Le quotient des dénombrements moyens pondérés est compris entre 5 et 15

Produit	10 ⁰		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		lg Na = lg ($\bar{x} \times 10$)	lg R = lg N0 - lg Na	Temps de contact
	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2			
2%	>660	>660	293	290	29	29	4	3	4,46	3,88	5 min
	>660	>660	238	233	22	25	2	3	4,37	3,97	10 min
	>660	>660	125	120	12	12	0	0	4,09	4,25	60 min

Produit	10 ⁰		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		lg Na = lg ($\bar{x} \times 10$)	lg R = lg N0 - lg Na	Temps de contact
	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2			
5%	>660	>660	242	234	24	25	2	3	4,38	3,96	5 min
	114	105	10	13	1	0	0	0	3,04	5,30	10 min
	6	5	0	1	0	0	0	0	<2,15	>6,19	60 min

Produit	10 ⁰		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		lg Na = lg ($\bar{x} \times 10$)	lg R = lg N0 - lg Na	Temps de contact
	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2			
10%	102	105	9	10	1	0	0	0	3,01	5,33	5 min
	67	60	7	6	0	0	0	0	2,80	5,54	10 min
	18	21	2	2	0	0	0	0	2,29	6,05	60 min

Légende :

- Vc = dénombrement par ml
- \bar{x} = moyenne de Vc1 et Vc2
- N = nombre d'UFC/ml dans la suspension d'essai
- Nv = nombre d'UFC/ml dans la suspension de validation
- A = nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation des conditions expérimentales
- B = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de la toxicité du neutralisant
- C = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de l'inactivation par dilution-neutralisation
- Na = nombre d'UFC/ml des survivants après essai
- R = réduction (lg R = lg N0 - lg Na)

FEUILLE 2 DE RESULTATS DES ESSAIS SUR <i>Mycobacterium terrae</i> – REPETITION

Norme employée: EN 14348, phase 2, étape 1

Nom du produit : F010435V4

N° de lot: 5203B03

Nombre de boîtes : 2 boîtes / ml (2 ml au total)

Neutralisant : thiosulfate de sodium (2%).

Température d'essai : 20°C

Substances interférentes : albumine bovine 0,3 g/l

Souche d'essai : *Mycobacterium terrae* CIP 104321

Date des essais : 05/06/2018

Personne responsable : Stephanie MOROT-BIZOT

Signature :


Validation et contrôles

	Suspension de validation Nv0		Témoin des conditions expérimentales A		Témoin du neutralisant B		Validation de la méthode C	
Vc1	45	\bar{x}	48	\bar{x}	47	\bar{x}	33	\bar{x}
Vc2	43	44	43	45,5	44	45,5	36	34,5
	30 ≤ \bar{x} de Nv0 ≤ 160 x oui <input type="checkbox"/> non		\bar{x} de A est ≥ 0,5 × \bar{x} de Nv0 x oui <input type="checkbox"/> non		\bar{x} de B ≥ 0,5 × \bar{x} de Nv0 x oui <input type="checkbox"/> non		\bar{x} de C ≥ 0,5 × \bar{x} de Nv0 x oui <input type="checkbox"/> non	

Suspension d'essai et essai

Suspension d'essai (N)			log N	log N0
10 ⁻⁷	178	185	9,26	8,26
10 ⁻⁸	18	20		
8,17 ≤ log N0 ≤ 8,70? x oui <input type="checkbox"/> non				

Vérifications de la méthodologie:

- N est compris entre $1,5 \times 10^9$ UFC/ml et $5,0 \times 10^9$ UFC/ml
- N0 est compris entre $1,5 \times 10^8$ UFC/ml et $5,0 \times 10^8$ UFC/ml
- Nv0 est compris entre 30 et 160 UFC/ml
- Nv est compris entre 3×10^2 UFC/ml et $1,6 \times 10^3$ UFC/ml
- A, B et C sont égaux ou supérieurs à $0,5 \times Nv0$
- Le quotient des dénombrements moyens pondérés est compris entre 5 et 15

Produit	10 ⁰		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		lg Na = lg ($\bar{x} \times 10$)	lg R = lg N0 - lg Na	Temps de contact
	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2			
2%	>660	>660	313	326	40	39	4	4	4,51	3,75	5 min
	>660	>660	263	282	26	30	2	4	4,44	3,82	10 min
	>660	>660	145	138	16	15	2	2	4,15	4,11	60 min

Produit	10 ⁰		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		lg Na = lg ($\bar{x} \times 10$)	lg R = lg N0 - lg Na	Temps de contact
	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2			
5%	>660	>660	249	236	41	40	5	3	4,41	3,85	5 min
	123	117	11	10	2	0	0	0	3,08	5,18	10 min
	20	18	1	2	0	0	0	0	2,28	5,98	60 min

Produit	10 ⁰		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		lg Na = lg ($\bar{x} \times 10$)	lg R = lg N0 - lg Na	Temps de contact
	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2			
10%	135	123	12	13	1	2	0	0	3,11	5,15	5 min
	82	79	10	10	1	0	0	0	2,91	5,35	10 min
	9	8	0	0	0	0	0	0	<2,15	>6,11	60 min

Légende :

- Vc = dénombrement par ml
- \bar{x} = moyenne de Vc1 et Vc2
- N = nombre d'UFC/ml dans la suspension d'essai
- Nv = nombre d'UFC/ml dans la suspension de validation
- A = nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation des conditions expérimentales
- B = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de la toxicité du neutralisant
- C = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de l'inactivation par dilution-neutralisation
- Na = nombre d'UFC/ml des survivants après essai
- R = réduction (lg R = lg N0 - lg Na)

ANNEXE TECHNIQUE

MILIEUX DE CULTURE

- Bouillon Middlebrook 7H9, FLUKA, réf. 100957898, lot n° BCBC4788
- Enrichissement ADC 10%, FLUKA, réf. 101007527, lot n° BCBD4192
- Milieu Middlebrook et Cohn 7H10 SIGMA-ALDRICH, réf. M0303, lot n°BCBK3491V
- Enrichissement OADC 10%, FLUKA, réf. 100962567 , lot n° BCBC5497

DILUANT

Solution Tryptone-Sel (TS)

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée :

- Tryptone, Dominique Dutscher, réf.777472, lot n° 090633 -----1,00 g/L
- Chlorure de sodium, Grosseron, ref n°9020401, lot n° FR08 085 793-----8,50 g/L

pH final après autoclavage à 25°C : 7,0 ± 0,2

NEUTRALISANT

Ingrédients par litre d'eau distillée:

Thiosulfate de sodium, Sigma Aldrich, réf. 7249, lot n° BCBD0584V ----- 20 g

Stérilisé par filtration sur filtre 0,45 µm ; pH à 25°C : 7,4 ± 0,1

SUBSTANCES INTERFÉRENTES

Sérum Albumine Bovine en poudre, Fraction V, Dominique Dutscher, réf.871001, lot D1304039

RAPPORT D'ESSAI

DETERMINATION DE L'ACTIVITE TUBERCULOCIDE
DU PRODUIT F010435V4 SELON LA NORME EN 14563

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du: 12/02/2018

Références du dossier d'analyses: n°241D17-2017-09

ESSAIS DE MYCOBACTERICIDIE :

Selon la méthodologie de la norme européenne NF EN 14563 (Février 2009) – antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai quantitatif de porte-germe pour l'évaluation de l'activité mycobactéricide ou tuberculocide des désinfectants chimiques utilisés pour instruments en médecine humaine

Essais sur 1 souche de référence: *Mycobacterium terrae*.

Ce rapport d'essai comporte 10 pages et ne concerne que l'échantillon étudié.

Date d'émission : 12/05/2018

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

Professeur Georges HERBEIN
Professeur des Universités Praticien Hospitalier
Expert scientifique

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Stéphanie Morot-Bizot'.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Georges Herbein'.

SOMMAIRE

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES ESSAIS	3
2. IDENTIFICATION COMPLETE DES ECHANTILLONS	3
3. CONDITIONS EXPERIMENTALES	3
4. VALIDATION DE LA METHODE ET RESULTATS PROPREMENT DITS	4
5. CONCLUSIONS	4
6. FEUILLE 1 DE RESULTATS DES ESSAIS SUR <i>Mycobacterium terrae</i>	5
7. FEUILLE 4 DE RESULTATS DES ESSAIS SUR <i>Mycobacterium terrae</i> – REPETITION	6
8. ANNEXE TECHNIQUE.....	9

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES ESSAIS

APEX BIOSOLUTIONS
4, rue des Grandes Pièces
25770 SERRE LES SAPINS
FRANCE

2. IDENTIFICATION COMPLETE DES ECHANTILLONS

PRODUIT F010435V4

Numéro de lot: 5203B03

Echantillons reçus au laboratoire le : 11/04/2018

Date limite d'utilisation optimale: non précisée

Fabricant: FRANKLAB

Date de fabrication: non précisée

Conditions de stockage : à température ambiante et à l'obscurité

Composants actifs: ammoniums quaternaires

Aspect: liquide vert

Diluant préconisé par le fabricant: eau potable

Période de l'étude: du 02/03/2018 (mise en culture des souches) au 30/04/2018

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Concentration du produit soumis à l'essai : 2%, 5% et 10%
- Apparence du produit et de ses dilutions : limpide.
- Méthode employée: dilution-neutralisation.
- Temps de contact: 10 min, 15 min et 60 min.
- Température d'essai: 20°C ± 1°C.
- Substances interférentes: en conditions de saleté, sérum albumine bovine 3 g/L + érythrocytes de mouton 3 mL/L.
- Diluant du produit utilisé lors des essais : eau dure.
- Souches de mycobactéries utilisées: *Mycobacterium terrae* CIP 104321, lot n°16308 (Institut Pasteur).
- Conditions de culture: bouillon Middlebrook 7H9 ADC 10%, milieu Middlebrook 7H10 OADC 10%, à 37°C ± 1°C.

4, rue des Grandes Pièces, zone Eurespace, 25 770 SERRE LES SAPINS ■ Tel: 09.62.52.91.87 ■ SARL au capital de 10 000 € ■ RCS BESANÇON ■ N° SIRET 51786053200012 ■ N° TVA intra FR 23517860532 ■ info@apexlabo.com

- Stabilité du produit en présence de substance interférente : bonne.
- Mode opératoire : par dilution-neutralisation, avec neutralisant à base de polysorbate 80, de thiosulfate de sodium et de jaune d'œuf (composition en annexe).

4. VALIDATION DE LA METHODE ET RESULTATS PROPREMENT DITS

Voir feuilles de résultats.

Le produit F010435V4 est bien actif vis-à-vis des souches de référence utilisées, car la réduction obtenue est supérieure à 4 log:

En conditions de saleté (moyenne des répétitions):

- pour *Mycobacterium terrae*, R = 4,08 dès la concentration de 5%, pour 10 min de contact

5. CONCLUSIONS

Conformément à la norme EN 14563 (Février 2009), le produit F010435V4, lot n° 5203B03:

- présente une activité tuberculocide vis-à-vis de la souche *Mycobacterium terrae* en 10 min à 20°C, dans les conditions de saleté, lorsqu'employé à la concentration de 5 %.



6. FEUILLE 1 DE RESULTATS DES ESSAIS SUR *Mycobacterium terrae*

Norme employée: EN 14563, phase 2, étape 2

Nom du produit : F010435V4

N° de lot: 5203B03

Nombre de boîtes : 2 boîtes / ml (2 ml au total)

Neutralisant : polysorbate 80 (30 g/l) ; thiosulfate de sodium (3 g/l), jaune d'œuf frais (5%)

Température d'essai : 20°C

Substances interférentes : albumine bovine 3 g/L + érythrocytes de mouton 3 mL/L

Souche d'essai : *Mycobacterium terrae* CIP 104321

Date des essais : 17/04/2018

Personne responsable : Stephanie MOROT-BIZOT

Signature :


Validation et contrôles

	B1	B2	B3	B4	Vc1	Vc2	Nv0 =
Suspension de validation Nv0	30	25	22	21	55	43	49
$30 \leq \bar{x} \text{ de Nv0} \leq 160$ <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non							
Témoin des conditions expérimentales (A)	30	29	33	25	59	58	58,5
$\bar{x} \text{ de A est } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de Nv0}$ <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non							
Témoin du neutralisant (B)	24	20	21	21	44	42	43
$\bar{x} \text{ de B } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de Nv0}$ <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non							
Validation de la méthode (C) produit à 10%	22	18	19	19	40	38	39
$\bar{x} \text{ de C } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de Nv0}$ <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non							

Suspension d'essai et essai

Suspension d'essai N	N	Vc1	Vc2	N = 2,5 x 10 ⁹ lg N = 9,41 9,17 ≤ lg N ≤ 9,70? ×oui □non
	10 ⁻⁷	257	247	
	10 ⁻⁸	26	28	

Témoin eau Nw		Vc1	Vc2	Nw = $\bar{x} \times 10 = 5,50 \times 10^6$ lg Nw = 6,74 6,15 ≤ log Nw ≤ (log N - 1,3)? ×oui □non
	10 ⁻⁴	48	60	
	10 ⁻⁵	7	5	

Vérifications de la méthodologie:

- N est compris entre 1,5 x 10⁹ UFC/ml et 5,0 x 10⁹ UFC/ml
- Nw n'est pas inférieur à 1,4 × 10⁶ UFC/ml (lg Nw ≥ 6,15) et n'est pas supérieur à 0,05 × N (lg Nw ≤ (lg N - 1,3))
- Nv est compris entre 3 x 10¹ UFC/ml et 1,6 x 10² UFC/ml
- A, B et C sont égaux ou supérieurs à 0,5 x Nv0

Produit	10⁰		10⁻¹		10⁻²		10⁻³		lg Na = lg ($\bar{x} \times 10$)	lg R = lg Nw - lg Na	Temps de contact
	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2			
5.0 %	49	44	5	2	0	0	0	0	2,67	4,07	10 min
10.0 %	31	28	4	2	0	0	0	0	2,47	4,27	10 min
2.0 %	2	1	0	1	0	0	0	0	2,15	4,59	60 min
2.0 %	67	66	7	8	1	0	0	0	2,82	3,92	15 min

Légende :

Vc = dénombrement par ml

 \bar{x} = moyenne de Vc1 et Vc2

N = nombre d'UFC/ml dans la suspension d'essai

Nv = nombre d'UFC/ml dans la suspension de validation

A = nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation des conditions expérimentales

B = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de la toxicité du neutralisant

C = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de l'inactivation par dilution-neutralisation

Na = nombre d'UFC/ml des survivants après essai

R = réduction (lg R = lg N0 - lg Na)

7. FEUILLE 4 DE RESULTATS DES ESSAIS SUR *Mycobacterium terrae* -

4, rue des Grandes Pièces, zone Eurespace, 25 770 SERRE LES SAPINS ■ Tel: 09.62.52.91.87 ■ SARL au capital de 10 000 € ■ RCS BESANÇON ■ N° SIRET 51786053200012 ■ N° TVA intra FR 23517860532 ■ info@apexlabo.com

REPETITION

Norme employée: EN 14563, phase 2, étape 2

Nom du produit : F010435V4

N° de lot: 5203B03

Nombre de boîtes : 2 boîtes / ml (2 ml au total)

Neutralisant : polysorbate 80 (30 g/l) ; thiosulfate de sodium (3 g/l), jaune d'œuf frais (5%)

Température d'essai : 20°C

Substances interférentes : albumine bovine 3 g/L + érythrocytes de mouton 3 mL/L

Souche d'essai : *Mycobacterium terrae* CIP 104321

Date des essais : 18/04/2018

Personne responsable : Stephanie MOROT-BIZOT

Signature :



Validation et contrôles

	B1	B2	B3	B4	Vc1	Vc2	Nv0 =
Suspension de validation Nv0	20	19	23	23	39	46	42,5
$30 \leq \bar{x} \text{ de Nv0} \leq 160$ <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non							
Témoin des conditions expérimentales (A)	A	27	28	27	25	55	52
$\bar{x} \text{ de A est } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de Nv0}$ <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non							
Témoin du neutralisant (B)	21	24	23	23	45	46	45,5
$\bar{x} \text{ de B } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de Nv0}$ <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non							
Validation de la méthode (C) produit à 10%	21	17	17	18	38	35	36,5
$\bar{x} \text{ de C } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de Nv0}$ <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non							

Furq - EN14563 - 11.21

Suspension d'essai et essai

Suspension d'essai N	N	Vc1	Vc2	N = $1,9 \times 10^9$ lg N = 9,27 9,17 ≤ lg N ≤ 9,70? ×oui □non
	10 ⁻⁷	188	184	
	10 ⁻⁸	20	19	

Témoin eau Nw		Vc1	Vc2	Nw = $\bar{x} \times 10 = 5,5 \times 10^6$ lg Nw = 6,74 6,15 ≤ log Nw ≤ (log N - 1,3)? ×oui □non
	10 ⁻⁴	53	55	
	10 ⁻⁵	6	8	

Vérifications de la méthodologie:

- N est compris entre $1,5 \times 10^9$ UFC/ml et $5,0 \times 10^9$ UFC/ml
- Nw n'est pas inférieur à $1,4 \times 10^6$ UFC/ml (lg NW ≥ 6,15) et n'est pas supérieur à $0,05 \times N$ (lg NW ≤ (lg N - 1,3))
- Nv est compris entre 3×10^1 UFC/ml et $1,6 \times 10^2$ UFC/ml
- A, B et C sont égaux ou supérieurs à $0,5 \times Nv0$

Produit	10 ⁰		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		lg Na = lg ($\bar{x} \times 10$)	lg R = lg Nw - lg Na	Temps de contact
	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2	Vc1	Vc2			
5.0 %	57	50	6	5	1	0	0	0	2,73	4,01	10 min
10.0 %	33	35	3	4	0	0	0	0	2,53	4,21	10 min
2.0 %	8	2	2	0	0	0	0	0	2,15	4,59	60 min
2.0 %	86	84	10	8	0	0	0	0	2,93	3,81	15 min

Légende :

Vc = dénombrement par ml

 \bar{x} = moyenne de Vc1 et Vc2

N = nombre d'UFC/ml dans la suspension d'essai

Nv = nombre d'UFC/ml dans la suspension de validation

A = nombre d'UFC/ml dans l'essai de validation des conditions expérimentales

B = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de la toxicité du neutralisant

C = nombre d'UFC/ml dans le mélange d'essai de validation de l'inactivation par dilution-neutralisation

Na = nombre d'UFC/ml des survivants après essai

R = réduction (lg R = lg N0 - lg Na)

8. ANNEXE TECHNIQUE

MILIEUX DE CULTURE

- Bouillon Middlebrook 7H9, FLUKA, réf. 100957898, lot n° BCBC4788
- Enrichissement ADC 10%, FLUKA, réf. 101007527, lot n° BCBD4192
- Milieu Middlebrook et Cohn 7H10 SIGMA-ALDRICH, réf. M0303, lot n°BCBK3491V
- Enrichissement OADC 10%, FLUKA, réf. 100962567 , lot n° BCBC5497

DILUANT

Solution Tryptone-Sel (TS)

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée :

- Tryptone, Laboratoires CONDA, réf. 1612, lot n° 091229 -----1,00 g/l
- Chlorure de sodium, Dominique DUTSCHER, ref n° 19032391, lot n° 836751-----8,50 g/l

pH final après autoclavage à 25°C : 7,0 ± 0,2

NEUTRALISANT

Ingrédients par litre d'eau distillée:

- Polysorbate 80, SIGMA ALDRICH, réf. 59924, lot n° BCBJ6978V ----- 30 g
- Jaune d'œuf frais ----- 50 ml
- Thiosulfate de sodium, Sigma Aldrich, réf. 7249, lot n° BCBD0584V ----- 3 g

Stérilisé par filtration sur filtre 0,45 µm ; pH à 25°C : 7,4 ± 0,1

SUBSTANCES INTERFÉRENTES

Sérum Albumine Bovine en poudre, Dominique Dutscher, réf. P6154, lot M10637P6154

Sang de mouton, Thermofisher, réf. SR0051C, lot n°33787000.

PORTE-GERMES EN VERRE – lames de verre dépoli 15 x 60 mm, 1 mm d'épaisseur – Thermo scientific/
Menzel-Gläser – réf. 100 OTM, lot n°01 1794389.

EAU DURE

Solution A: - MgCl₂ anhydre, réf. M8266, lot n° 108K0068, SIGMA ALDRICH

- CaCl₂ anhydre, réf. C1016, lot n° 059K0030, SIGMA ALDRICH

Solution B: - NaHCO₃, réf. S6014, lot n°059K0052, SIGMA ALDRICH

pH final après filtration: $7,0 \pm 0,2$ à 25°C.

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE DU
PRODUIT F010435V4 SELON LA NORME EN 14476**

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du : 08/10/2019

Références du dossier d'analyses : n°233D33-2019-14

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 : *herpès virus*.



Ce rapport inclus 12 pages.

Date d'édition : 16/12/2019

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





APEX
BIOSOLUTIONS
4, rue des grandes pièces
25770 Serre les sapins
tel 09 62 52 91 87 - info@apexlabo.com
n°SIRET 517 860 532 00012
n° TVA intra FR 2351 7860532

Editor	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Mrs Stephanie MOROT-BIZOT, Director
	

SOMMAIRE

1.	LABORATOIRE AYANT REALISE LES ESSAIS	3
2.	IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS.....	3
3.	CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	3
4.	TITRE VIRAL	4
5.	VALIDATION.....	4
6.	ESSAIS PROPREMENT DITS – CALCUL DE L’ACTIVITE VIRUCIDE	5
7.	VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE.....	5
8.	CONCLUSION.....	6
9.	ANNEXE TECHNIQUE 1.....	6

Editor	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Mrs Stephanie MOROT-BIZOT, Director
	

1. LABORATOIRE AYANT REALISE LES ESSAIS

APEX BIOSOLUTIONS
4, rue des Grandes pièces
Zone EURESPACE
25770 SERRE LES SAPINS
France

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

Référence	Lot N°
F010435V4	5771

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 vert

Précautions d'emploi : aucune



Diluant préconisé par le fabricant : eau potable

Date de réception au laboratoire : 17/10/2019

Période de l'étude : du 01/10/2019 au 13/12/2019

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Température d'essai : 20°C ± 1°C
- Méthode de titrage : log DICT₅₀
- Temps de contact : 1 min – 5 min – 10 min
- Concentrations finales : 0.50%
- Diluant du produit utilisé lors des essais : eau dure
- Souche virale : herpes virus type 1(ATCC ref. VR-260), cultivé sur cellules VERO, à 37°C, sous atmosphère à 5% CO₂
- Substances interférentes : 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton
- Stabilité du produit en présence de substance interférente : bonne
- Technique d'arrêt de l'action virucide : à froid

Editor	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Mrs Stephanie MOROT-BIZOT, Director
	

4. TITRE VIRAL

Titration par effet cytopathique de la suspension virale d'essai (calculé selon la méthode de Spearman-Kärber) = 7,000 log DICT₅₀

5. VALIDATION

a) Cytotoxicité

Le produit F010435V4 a été testé sur des cultures de cellules VERO et une faible toxicité a été observée 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.

Dilution du produit		Titre de virus (log DICT ₅₀)		
		Suspension virale sur cellules non traitées	Suspension virale sur cellules traitées	Différence de titre viral (log DICT ₅₀)
F010435V4	10 ⁻²	7,000	6,750	0,250

Le produit testé à la concentration indiquée ci-dessus ne montre pas d'influence notable sur la méthode de titrage de l'herpès virus (différence < 1 log).

c) Validations de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit :



Concentration	Substance interférente	Titre de virus (log DICT ₅₀)	Différence avec la suspension virale d'essai
F010435V4 0.5%	3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	ESSAI 1: 7,000	0,00
		ESSAI 2: 7,000	0,00

La méthode est validée si la différence est ≤ 0,5 log.

d) Essai d'inactivation de référence en formaldéhyde 0,7%

	Titre viral (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral (log DICT ₅₀)
Suspension virale témoin	7,000	
Essai d'inactivation 5 min	6,625	0,375
Essai d'inactivation 15 min	6,000	1,000
Essai d'inactivation 15 min	5,500	1,500

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. La réduction est de 1,500 log après 30 min et les conditions de la norme sont donc remplies.

Editor	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Mrs Stephanie MOROT-BIZOT, Director
	

6. ESSAIS PROPRESMENT DITS – CALCUL DE L’ACTIVITE VIRUCIDE

ESSAI 1 - La suspension virale témoin a une concentration de 7,000 log DICT₅₀.

PRODUIT	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température	Titre viral (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral
F010435V4	0,5%	1 min	20°C	3,625	3,375
		5 min		2,750	4,250
		10 min		2,500	4,500

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

ESSAI 2 - La suspension virale témoin a une concentration de 7,000 log DICT₅₀.



PRODUIT	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température	Titre viral (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral
F010435V4	0,5%	1 min	20°C	3,750	3,250
		5 min		2,625	4,375
		10 min		2,500	4,500

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

7. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE

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

- 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 7,000 log DICT₅₀ pour l’herpès 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; la différence est de 1,500 log après 30 min d’inactivation par le formaldéhyde pour l’herpès virus.
- Le produit testé n’affecte pas significativement la morphologie des cellules.
- Les conditions d’essai en conditions de saleté n’affectent pas l’infectivité du virus
- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité des cellules :
 - les titres de virus mis en contact avec les cellules traitées avec le produit et les cellules non traitées ont une différence inférieure à 1,0 log (la différence est de 0,250 log).

Editor	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Mrs Stephanie MOROT-BIZOT, Director
	

8. CONCLUSION

Les essais réalisés sur le produit F010435V4 ont démontré :

- Que le produit F010435V4 employé à 0,5% finaux a une activité virucide sur l'herpès virus selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A2, pour 5 min de contact à 20°C, en conditions de saleté.



9. ANNEXE TECHNIQUE 1

Lignée cellulaire : cellules VERO (RD-Biotech ref. 84009, lot n°110118-110V)

Souche virale : herpes virus type 1 (ATCC ref. VR-260, lot n°58167228)

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, Sigma Aldrich, réf. 05479, lot n° STBB7838V

Solution d'inactivation :

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





Editor	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician 	Mrs Stephanie MOROT-BIZOT, Director 

Tableau A1 - Titrage de l'herpès virus, selon la méthode de Spaerman-Kärber:

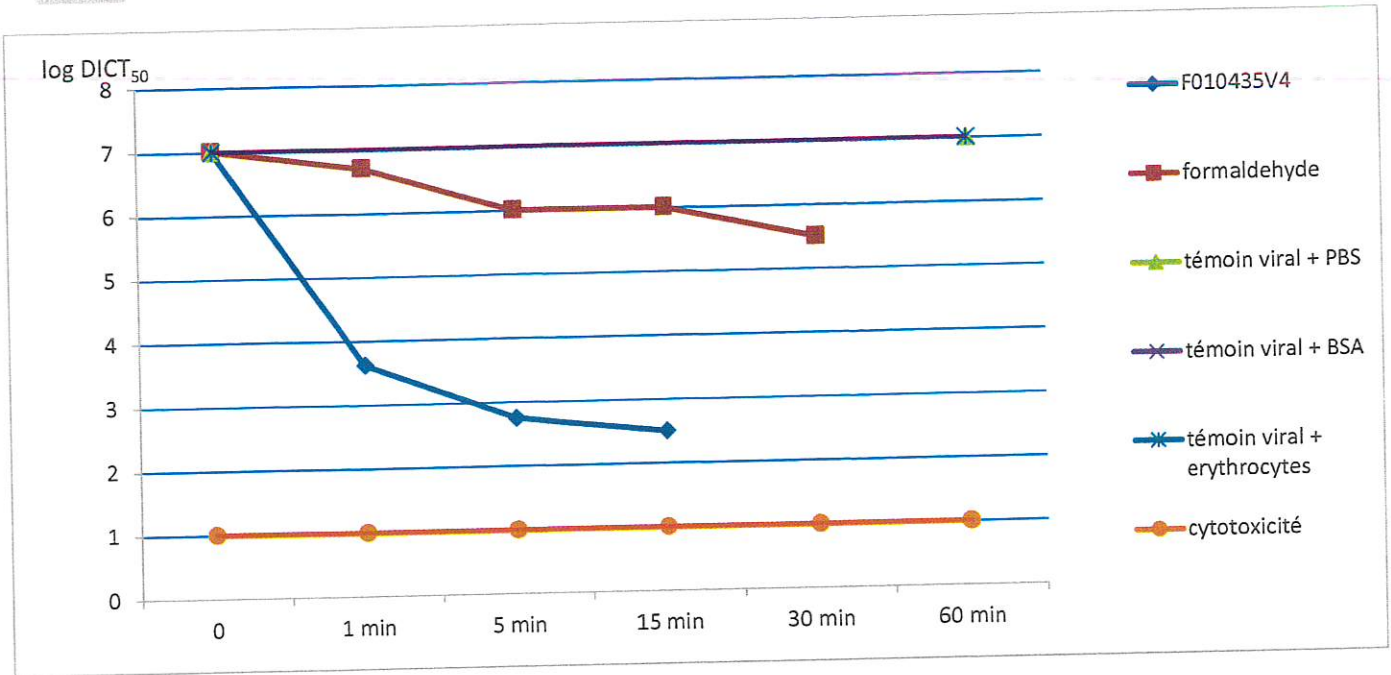
Log TCID₅₀ = 7,000

Dilution (- log)	Résultat	% résultats positifs
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	44444444	100
-6	44444444	100
-7	44440000	50
-8	00000000	0
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Somme des % de cultures positives		450,0

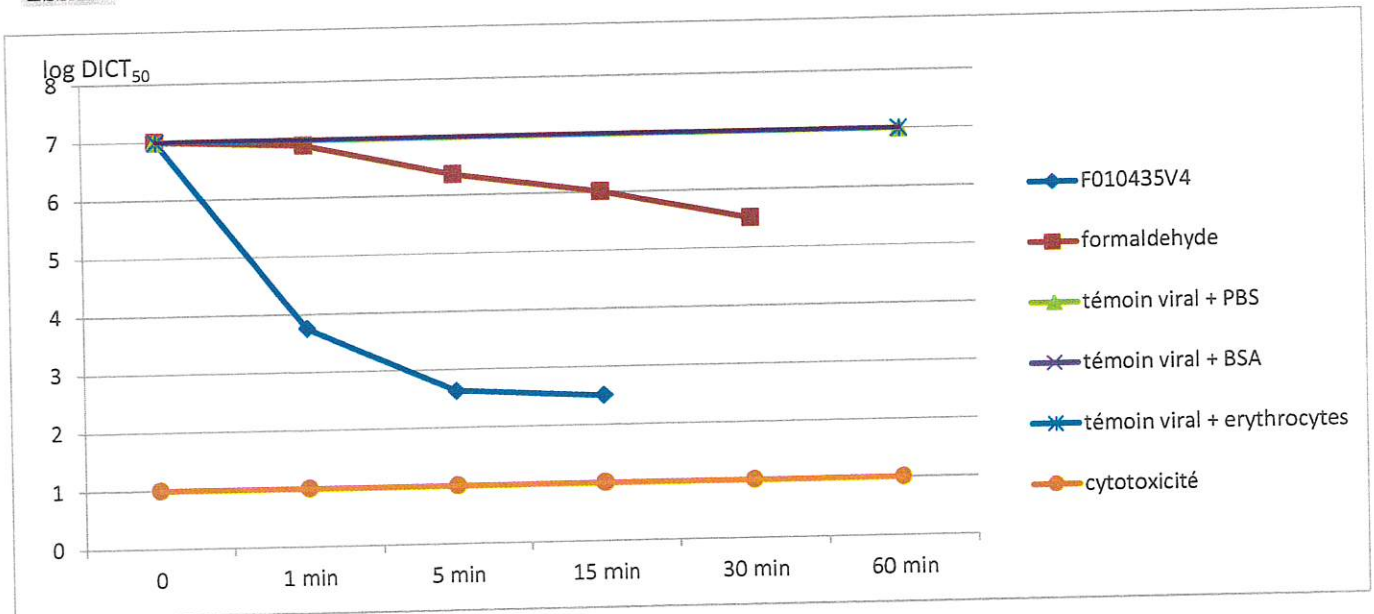
Editor	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Mrs Stephanie MOROT-BIZOT, Director
	

Graphique

ESSAI 1



ESSAI 2





Editor	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Mrs Stephanie MOROT-BIZOT, Director
	

Tableau A2 — Tableau de résultats du produit F010435V4 soumis à essai contre l'herpès virus en conditions de saleté

Produit	Concentration	Substance interférente	Niveau de cytotoxicité	Lg DICT ₅₀						Réduction
				0	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min	
F010435V4 essai 1	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml/l érythrocytes	1,000	7,000	3,625	2,750	2,500	N.T.	N.T.	5 min R = 4,25
F010435V4 essai 2	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml/l érythrocytes	1,000	7,000	3,750	2,625	2,500	N.T.	N.T.	5 min R = 4,375
Formaldéhyde Essai 1	0,70%	PBS	2,000	7,000	N.T.	6,625	6,000	5,500	N.T.	
Formaldéhyde Essai 2	0,70%	PBS	2,250	7,000	N.T.	6,500	6,000	5,500	N.T.	
Témoin infectivité Essai 1	N.A.	PBS	N.A.	7,000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7,000	
Témoin infectivité Essai 1	N.A.	3 g/l BSA	N.A.	7,000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7,000	
Témoin infectivité Essai 1	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml/l érythrocytes	N.A.	7,000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7,000	
Témoin infectivité Essai 2	N.A.	PBS	N.A.	7,000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7,000	
Témoin infectivité Essai 2	N.A.	3 g/l BSA	N.A.	7,000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7,000	
Témoin infectivité Essai 2	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml/l érythrocytes	N.A.	7,000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	7,000	
Sensibilité des cellules au virus	10 ⁻²	N.A.	Cellules non traitées	7,000						
		N.A.	Cellules traitées	6,750						



Editor	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Mrs Stephanie MOROT-BIZOT, Director
	

Tableau A3 — Résultats bruts ESSAI 1

	Concentration	Substance interférente	Temps de contact	Dilutions								
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9
F010435V4	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	1 min	4444	4444	4444	4000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			5 min	4444	4444	4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			10 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			Témoin viral	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000
F010435V4	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A.	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Formaldéhyde	0,70%	PBS	5	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000
			15	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000
			30	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000
Formaldéhyde (cytotoxicité)	0,70%	PBS	N.A.	4444	4444	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
Témoin viral infectivité	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000
Témoin viral infectivité	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000
Témoin viral infectivité	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000



Editor	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Mrs Stephanie MOROT-BIZOT, Director
	

Tableau A4 — Résultats bruts ESSAI 2

	Concentration	Substance interférente	Temps de contact	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	
F010435V4	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	1 min	4444	4444	4444	4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
			5 min	4444	4444	4000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
10 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000			
	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000			
Témoin viral				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
F010435V4	0,50%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A.	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
				0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
Formaldéhyde	0,70%	PBS	5	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	
Formaldéhyde (cytotoxicité)	0,70%	PBS	N.A.	4444	4444	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	
Témoin viral infectivité	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
60				4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
Témoin viral infectivité	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
Témoin viral infectivité	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	



Editor	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Mrs Stephanie MOROT-BIZOT, Director
	

Tableau A5 - Sensibilité des cellules à l'herpès virus:

Produit	Dilution	Substance interférente		Dilutions								
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	
F010435V4	10 ⁻²	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	Cellules non traitées	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000
			Cellules traitées	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000
			Cellules non traitées	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4400	0000	0000
			Cellules traitées	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000

Editor	Supervisor
Ms Emilie CANTREL, laboratory technician	Mrs Stephanie MOROT-BIZOT, Director
