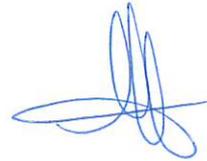


# EQUIVALENCE ENZYMEX P

| Formula code | FRANKLAB Designation | Packaging      | FRANKLAB Commercial reference |
|--------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| F010436V6    | ENZYMEX P            | 2x4 Kg buckets | 1043613                       |
|              |                      | 2x2 Kg buckets | 10436138                      |
|              |                      | 2x1 Kg buckets | 10436112                      |

Louisa KDYEM  
Regulatory Affairs Manager



RAPPORT D'ESSAI

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

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du: 17/07/2014

Références du dossier d'analyses: n°295D11-2014-14

**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 levuricide pour instruments utilisés en médecine humaine.

Essai sur une souche : *Candida albicans*.

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

Date d'émission : 31/12/2014

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

Professeur Georges HERBEIN  
Professeur des Universités  
Médecin Hospitalier  
Expert scientifique

**APEX BIOSOLUTIONS**  
18, rue Alain SAVARY  
25000 Besançon  
Tél : 03 81 25 09 04 Fax : 03 81 25 53 51  
info@apexbiosolutions.com  
N° SIRET 517 860 532 00012 – RCS Besançon  
N° TVA intra FR 23517860532  
SARL au capital de 10 000 €

## 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**

| Référence | N° lot  |
|-----------|---------|
| ENZYMEX P | 4828-03 |

Echantillons reçus au laboratoire le 28/11/2014.

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: poudre blanche

Diluant préconisé par le fabricant: eau potable, une dose de 20 g à dissoudre dans 4 L d'eau

Période de l'étude: du 29/12/2014 au 31/12/2014

**3. CONDITIONS EXPERIMENTALES**

- Concentration du produit soumis à l'essai : produit pur et à 10%
- Méthode employée: dilution-neutralisation
- Temps de contact: 5 min – 10 min – 15 min
- Température d'essai: 20°C
- Substance interférente: Albumine bovine (3g/L) et érythrocytes de mouton (3 ml/mL)
- Diluant des suspensions bactériennes et des essais : solution tryptone sel stérile.
- Souche levure utilisée : *Candida albicans* CIP 48.72 lot 265.09
- Conditions de culture des souches : 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 frais dans de l'eau distillée.

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

6480-0094-5001

#### 4. RESULTATS PROPUREMENT DITS

Voir feuilles de résultats.

#### SYNTHESE RESULTATS

Le produit ENZYMEX P est bien actif vis-à-vis des souches de référence utilisées, car la réduction moyenne obtenue est supérieure à 4 log pour les cellules levuriques viables.

- Pour *C.albicans*,  $R > 4,39$  pour 5 min de contact

#### 5. CONCLUSION

**Conformément à la norme EN 14562 (Septembre 2006), le produit ENZYMEX P:**

- a une activité levuricide sur la souche de référence *Candida albicans* lorsqu'employé pur, pour 5 min de contact à 20°C, en conditions de saleté (3 g/L d'albumine bovine et 3 mL/L d'érythrocytes de mouton).





**Suspension d'essai et essai**

| Suspension d'essai (N) |     |     | log N |
|------------------------|-----|-----|-------|
| $10^{-6}$              | 225 | 212 | 8,35  |
| $10^{-7}$              | 30  | 25  |       |
| 8,17 ≤ N ≤ 8,70?       |     |     |       |
| x oui □ non            |     |     |       |

| Témoin eau (Nw)       |    |    | log Nw |
|-----------------------|----|----|--------|
| $10^{-4}$             | 36 | 33 | 6,54   |
| 6,15 ≤ Nw ≤ lg N-1,3? |    |    |        |
| x oui □ 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

|                         | Essais     |   |             |   |             |   |            |      |
|-------------------------|------------|---|-------------|---|-------------|---|------------|------|
|                         | 100% 5 min |   | 100% 10 min |   | 100% 15 min |   | 10% 15 min |      |
| $10^0$                  | 2          | 0 | 0           | 0 | 0           | 0 | >330       | >330 |
| $10^{-1}$               | 0          | 0 | 0           | 0 | 0           | 0 | 38         | 51   |
| $10^{-2}$               | 0          | 0 | 0           | 0 | 0           | 0 | 10         | 5    |
| $10^{-3}$               | 0          | 0 | 0           | 0 | 0           | 0 | 1          | 0    |
| log Na                  | <2,15      |   | <2,15       |   | <2,15       |   | 3,65       |      |
| log R = log Nw - log Na | >4,39      |   | >4,39       |   | >4,39       |   | 2,89       |      |

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 |
|------------------------|-----|-----|-------|
| $10^{-6}$              | 225 | 212 | 8,35  |
| $10^{-7}$              | 30  | 25  |       |
| 8,17 ≤ N ≤ 8,70?       |     |     |       |
| x oui □ non            |     |     |       |

| Témoïn eau (Nw)       |    |    | log Nw |
|-----------------------|----|----|--------|
| $10^{-4}$             | 35 | 32 | 6,53   |
| 6,15 ≤ Nw ≤ lg N-1,3? |    |    |        |
| x oui □ 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

|                         | Essais     |   |             |   |             |   |            |      |
|-------------------------|------------|---|-------------|---|-------------|---|------------|------|
|                         | 100% 5 min |   | 100% 10 min |   | 100% 15 min |   | 10% 15 min |      |
| $10^0$                  | 0          | 2 | 0           | 0 | 0           | 0 | >330       | >330 |
| $10^{-1}$               | 0          | 0 | 0           | 0 | 0           | 0 | 45         | 45   |
| $10^{-2}$               | 0          | 0 | 0           | 0 | 0           | 0 | 6          | 4    |
| $10^{-3}$               | 0          | 0 | 0           | 0 | 0           | 0 | 0          | 0    |
| log Na                  | <2,15      |   | <2,15       |   | <2,15       |   | 3,65       |      |
| log R = log Nw - log Na | >4,38      |   | >4,38       |   | >4,38       |   | 2,88       |      |

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°307171

### SUBSTANCES INTERFÉRENTES :

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

Sang de mouton, Analytic Lab, réf. 08449, lot n°bcbj3984V.

### 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 stérile :

- Thiosulfate de sodium, Sigma Aldrich, ref n°7249, lot n° BCBD0584V-----20 g/L

Stérilisé par autoclavage

**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: - MgCl<sub>2</sub> anhydre, réf. M8266, lot n° 108K0068, SIGMA ALDRICH

- CaCl<sub>2</sub> anhydre, réf. C1016, lot n° 059K0030, SIGMA ALDRICH

Solution B: - NaHCO<sub>3</sub>, réf. S6014, lot n°059K0052, SIGMA ALDRICH

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



## RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE LEVURICIDE DU PRODUIT  
F010436V6 SELON LA NORME EN 14562**

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du : 18/10/2018

Références du dossier d'analyses : n°268D25-2018-15

### 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 8 pages et ne concerne que les échantillons étudiés.

Date d'émission : 24/12/2018

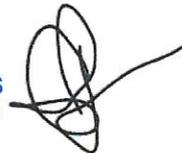
Stéphanie MOROT-BIZOT  
Docteur en microbiologie  
Chargée de l'étude

Professeur Georges HERBEIN  
Professeur des Universités Praticien Hospitalier  
Expert scientifique



**APEX BIOSOLUTIONS**  
4, rue des grandes pièces  
25770 Serre les sapins

tél 09 62 52 91 87 - info@apexlabo.com  
n°SIRET 517 860 532 00012  
n° TVA intra FR 2351 7860532



**SOMMAIRE**

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS .....3

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS .....3

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES .....3

4. RESULTATS PROPREMENT DITS.....4

5. CONCLUSION .....4

6. FEUILLES DE RESULTATS .....4

7. *Candida albicans* - ESSAI.....4

8. *Candida albicans* – REPETITION .....6

9. ANNEXE TECHNIQUE .....8

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

**1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS**

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

**2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS**

| Echantillon | N° lot |
|-------------|--------|
| F010436V6   | 5411   |

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 : poudre blanche

Précautions d'emploi : aucune

Diluant préconisé par le fabricant : eau potable, 1 dose de 20 g dans 5 L d'eau

Date de réception au laboratoire : 24/10/2018

Période de l'étude : du 09/11/2018 au 05/12/2018

**3. CONDITIONS EXPERIMENTALES**

- Concentration du produit soumis à l'essai : 0.4%.
- Méthode employée : EN 14562
- Temps de contact : 5 min, 10 min, 15 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 levuriennes 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 (ATCC 10231) - Institut Pasteur.
- Technique d'arrêt de l'action levuricide : 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.

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

#### 4. RESULTATS PROPUREMENT DITS

Le produit F010436V6 est bien actif vis-à-vis des souches de référence utilisées, car la réduction obtenue est supérieure à 4 log :

Voir feuilles de résultats.

- actif sur *Candida albicans* dès 10 min de contact car  $R = 4,04 \log$

#### 5. CONCLUSION

Conformément à la norme EN 14562 (Septembre 2006), le produit F010436V6, lot n° 5411 :

- a une activité levuricide sur la souche levurienne *Candida albicans* lorsqu'employé à 0.4%, pour 10 min de contact à 20°C, en conditions de saleté (albumine bovine à 3g/L et érythrocytes de mouton à 3 mL/L).

#### 6. FEUILLES DE RESULTATS

Voir ci-après.

#### 7. *Candida albicans* - ESSAI

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

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 ( $\lg R = \lg N0 - \lg Na$ )

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

|   |   |
|---|---|
| <p>Norme: EN 14562<br/>                 Produit : <b>F010436V6</b><br/>                 Lot N° : 5411<br/>                 Etude N° : 268D25-2018-15<br/>                 Date des essais : 20/11/2018</p>  | <p>Méthode:<br/> <input checked="" type="checkbox"/> Ensemencement dans la masse<br/> <input type="checkbox"/> Ensemencement en surface<br/> <input checked="" type="checkbox"/> Nombre de boîtes de Pétri/mL : 2</p> |
| <p>Neutralisant : polysorbate 80 (30g/L) + jaune d'œuf 5%<br/>                 Température des essais : 20°C<br/>                 Substance interférente : 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton<br/>                 Température d'incubation : 30°C ± 1°C<br/>                 Diluant : eau dure stérile</p> |   |

|                  | Suspension de validation           |             | Validation A                       |             | Validation B                       |             | Validation C                       |             | Suspension d'essai |     | Témoins eau        |     | Mode opératoire aux temps de contact |                    |      |        |             |        |                 |   |
|------------------|------------------------------------|-------------|------------------------------------|-------------|------------------------------------|-------------|------------------------------------|-------------|--------------------|-----|--------------------|-----|--------------------------------------|--------------------|------|--------|-------------|--------|-----------------|---|
|                  | VC1                                | VC2         | VC1                                | VC2         | VC1                                | VC2         | VC1                                | VC2         | VC1                | VC2 | Nw                 | VC1 | VC2                                  | 5 min              |      | 10 min |             | 15 min |                 |   |
| Candida albicans | 81                                 | 79          | 73                                 | 73          | 85                                 | 88          | 68                                 | 69          | 212                | 218 | 1.10 <sup>-3</sup> | 192 | 184                                  | 1.10 <sup>0</sup>  | 154  | 122    | 16          | 20     | 5               | 2 |
|                  | $\bar{X}$                          | <b>80,0</b> | $\bar{X}$                          | <b>73,0</b> | $\bar{X}$                          | <b>86,5</b> | $\bar{X}$                          | <b>68,5</b> | 23                 | 22  | 1.10 <sup>-4</sup> | 21  | 19                                   | 1.10 <sup>-1</sup> | 18   | 13     | 2           | 2      | 0               | 0 |
|                  | 30 ≤ Nv0 ≤ 160                     |             | A ≥ 0,5 * Nv0                      |             | B ≥ 0,5 * Nv0                      |             | C ≥ 0,5 * Nv0                      |             | Log N              |     | Log Nw             |     |                                      | Log Na             |      |        | 2,26        |        | <2,15           |   |
|                  | x oui <input type="checkbox"/> non |             | x oui <input type="checkbox"/> non |             | x oui <input type="checkbox"/> non |             | x oui <input type="checkbox"/> non |             | Log R              |     |                    |     |                                      |                    | 3,15 |        | <b>4,02</b> |        | <b>&gt;4,13</b> |   |

|  |  |
|--|--|
| <p><b>Rédacteur</b><br/>                 Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire</p>  | <p><b>Superviseur</b><br/>                 Mme Stéphanie MOROT-BIZOT, directrice</p>  |
|--|--|

**8. *Candida albicans* – REPETITION**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

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 ( $\lg R = \lg N0 - \lg Na$ )

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

|  |  |
|--|--|
| Norme: EN 14562<br>Produit : <b>F010436V6</b><br>Lot N° : 5411<br>Etude N° : 268D25-2018-15<br>Date des essais : 27/11/2018  | Méthode:<br><input checked="" type="checkbox"/> Ensemencement dans la masse<br><input type="checkbox"/> Ensemencement en surface<br><input checked="" type="checkbox"/> Nombre de boîtes de Pétri/mL : 2 |
| Neutralisant : polysorbate 80 (30g/L) + jaune d'œuf 5%<br>Température des essais : 20°C<br>Substance interférente : 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton<br>Température d'incubation : 30°C ± 1°C<br>Diluant : eau dure stérile |  |

|                         |                                    |             |                                    |             |                                    |             |                                    |             |                    |      |            |                    |                                      |       |        |        |       |        |   |   |
|-------------------------|------------------------------------|-------------|------------------------------------|-------------|------------------------------------|-------------|------------------------------------|-------------|--------------------|------|------------|--------------------|--------------------------------------|-------|--------|--------|-------|--------|---|---|
| <i>Candida albicans</i> | Suspension de validation           |             | Validation A                       |             | Validation B                       |             | Validation C                       |             | Suspension d'essai |      | Témoin eau |                    | Mode opératoire aux temps de contact |       |        |        |       |        |   |   |
|                         | VC1                                | VC2         | VC1                                | VC2         | VC1                                | VC2         | VC1                                | VC2         | VC1                | VC2  | Nw         | VC1                | VC2                                  | 5 min |        | 10 min |       | 15 min |   |   |
|                         | 75                                 | 78          | 71                                 | 71          | 68                                 | 76          | 65                                 | 60          | 1.10 <sup>6</sup>  | 223  | 237        | 1.10 <sup>-3</sup> | 163                                  | 174   | 118    | 127    | 16    | 14     | 2 | 0 |
|                         | $\bar{X}$                          | <b>76,5</b> | $\bar{X}$                          | <b>71,0</b> | $\bar{X}$                          | <b>72,0</b> | $\bar{X}$                          | <b>62,5</b> | 1.10 <sup>7</sup>  | 26   | 24         | 1.10 <sup>-4</sup> | 19                                   | 18    | 14     | 14     | 3     | 2      | 0 | 0 |
|                         | 30 ≤ Nv0 ≤ 160                     |             | A ≥ 0,5 * Nv0                      |             | B ≥ 0,5 * Nv0                      |             | C ≥ 0,5 * Nv0                      |             | Log N              | 8,37 |            | Log Nw             | <b>6,23</b>                          |       | Log Na | 3,09   | 2,18  | <2,15  |   |   |
|                         | x oui <input type="checkbox"/> non |             | x oui <input type="checkbox"/> non |             | x oui <input type="checkbox"/> non |             | x oui <input type="checkbox"/> non |             |                    |      |            |                    |                                      |       | 3,14   | 4,05   | >4,08 |        |   |   |

|  |  |
|--|--|
| Rédacteur<br>Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire<br> | Superviseur<br>Mme Stéphanie MOROT-BIZOT, directrice<br> |
|--|--|

**9. ANNEXE TECHNIQUE****MILIEUX DE CULTURE:**

GEM (Gélose à l'Extrait de Malt), Dominique DUTSCHER, réf. 777304, lot n° 712042

**SUBSTANCES INTERFÉRENTES :**

Sérum Albumine Bovine en poudre, Fraction V, Dominique Dutscher, réf.P6154, lot D1304039

Sang de mouton, Analytic Lab, réf. 08449, lot n°bcbj3984V

**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:

Polysorbate 80, SIGMA ALDRICH, réf. 59924, lot n° BCBJ6978V ----- 30 g

Jaune d'œuf frais ----- 50 ml

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

**EAU DURE**

Solution A: - MgCl<sub>2</sub> anhydre, réf. M8266, lot n° 108K0068, SIGMA ALDRICH

- CaCl<sub>2</sub> anhydre, réf. C1016, lot n° 059K0030, SIGMA ALDRICH

Solution B: - NaHCO<sub>3</sub>, 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.

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

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE**  
**DU PRODUIT ENZYMEX P VIS-A-VIS DU PSEUDORABIES VIRUS (PrV)**

Essai réalisé pour :  
FRANKLAB  
3 avenue des Frênes  
78180 Montigny le Bretonneux, France.

Laboratoire ayant réalisé les essais :  
Centre de Recherche INRA  
Equipe V2I - Vaccins Virus et Immunopathologie  
Unité Virologie et Immunologie Moléculaire  
(VIM) Bâtiment 440, Etage 1  
Domaine de Vilvert  
78352 Jouy-en-Josas, France.

**ESSAIS :**

Selon la méthodologie de la norme européenne NF EN 14476 (Septembre 2013).  
Le Pseudorabies Virus (PrV) est le modèle d'étude de l'Hépatite B humaine (VHB) selon l'OMS.  
Essais sur le Pseudorabies Virus (PrV) avec un produit utilisé à une concentration (0,5%) pendant 5, 10 et 15 minutes à 20° C.

Ce rapport comporte 10 pages.

Date d'émission: 14 octobre 2015

Chargé de l'étude :

Guillaume Fichet  
Docteur ès Sciences



## SOMMAIRE

|  |    |
|--|----|
| 1. Identification complète de l'échantillon .....                          | 3  |
| 2. Conditions expérimentales .....   | 3  |
| 3. Validation de la méthode .....  | 4  |
| 3.1. Méthodologie.....   | 4  |
| 3.2. Sensibilité des cellules aux virus .....                              | 4  |
| 3.3. Validations de l'efficacité d'arrêt de l'activité de l'ENZYMEX P..... | 5  |
| 3.4. Essais d'inactivation de référence.....                               | 6  |
| 4. Essais proprement dits-calcul de l'activité virucide .....              | 6  |
| 4.1. Essai ENZYMEX P 0.5% 5 minutes 20°C .....                             | 6  |
| 4.1.1. <i>Production virale lot 1</i> .....                                | 6  |
| 4.1.2. <i>Production virale lot 2</i> .....                                | 7  |
| 4.2. Essai ENZYMEX P 0.5% 10 minutes 20°C .....                            | 7  |
| 4.2.1. <i>Production virale lot 1</i> .....                                | 7  |
| 4.2.2. <i>Production virale lot 2</i> .....                                | 8  |
| 4.3. Essai ENZYMEX P 0.5% 15 minutes 20°C .....                            | 8  |
| 4.3.1. <i>Production virale lot 1</i> .....                                | 8  |
| 4.3.2. <i>Production virale lot 2</i> .....                                | 9  |
| 5. Vérification de la méthodologie .....                                   | 10 |
| 6. Conclusion .....  | 10 |

## 1. Identification complète de l'échantillon

Nom du produit : ENZYME X P

Numéro de lot : 4843

Fabricant : Franklab

Date de fabrication : 01 octobre 2014

Date de livraison : 04 décembre 2014

Date de péremption : 01 octobre 2016

Substances active : non communiqué

Conditions de stockage : température ambiante à l'abri de la lumière et de la chaleur dans un sachet commercialisé

Diluant du produit recommandé par le fabricant : eau

Aspect du produit : poudre blanche, très odorante

## 2. Conditions expérimentales

Période d'analyse : 12 janvier – 2 février 2015

Température d'essai : 20°C

Concentration d'essai : 0.5%

Temps de contact : 5, 10 et 15 minutes

Diluant du produit utilisé lors des essais : eau dure normée ( $6.8 < \text{pH} < 7.2$ )

Aspect du produit lors des dilutions étudiées : liquide limpide et incolore

Souche de virus testée : Pseudorabies Virus (PrV) (ATCC-VR-2107), incubation à 37°C à 5% de CO<sub>2</sub> amplifié après deux passages successifs sur monocouches de cellules PK15.

Substance interférente : conditions de saleté avec une solution d'albumine bovine à 3,0 g/L plus érythrocytes de moutons à 3,0 mL/L.

Stabilité du mélange produit-substance interférente: pas de précipité observé

Technique d'arrêt de l'action virucide et cytotoxique du produit : glace et tamisage moléculaire Microspin S400HR.

Méthode de titrage : virus titré en log DCIT<sub>50</sub> (titrage par effet cytopathique de la suspension virale d'essai du Pseudorabies Virus (PrV), calculé selon la méthode de Spearman-Kärber).

Méthode de filtration : colonne Microspin S400HR et recalcul du titre de la suspension virale après passage sur cette colonne (en log DCIT<sub>50</sub>).

### 3. Validation de la méthode

#### 3.1. Méthodologie

Le produit ENZYME X P a été testé sur des cultures de cellules PK15 et une cytotoxicité a été observée jusqu'à la dilution 10<sup>-3</sup>. Nous avons alors utilisé le tamisage moléculaire par colonne Microspin S400HR pour supprimer celle-ci.

#### 3.2. Sensibilité des cellules aux virus

Un titrage comparatif du virus est réalisé sur les cellules traitées ou non par le produit (sans utilisation de colonne Microspin S400HR).

| Dilution produit               | Titre de virus en log DCIT <sub>50</sub>    |   |   |
|--------------------------------|---|---|---|
|                                | Suspension virale sur cellules non traitées | Suspension virale sur cellules traitées | Différence de titre viral en log DCIT <sub>50</sub> |
| ENZYME X P<br>10 <sup>-3</sup> | 7,70  | 7,60                                    | <b>0,1</b>  |

La norme demande que la différence de titre viral soit inférieure à 1,0 log. Le produit ENZYME X P utilisé à 0.5% ne montre donc pas d'influence sur la méthode de titrage du Pseudorabies Virus (PrV) (0,1 log).

### 3.3. Validations de l'efficacité d'arrêt de l'activité de l'ENZYMEX P

Comme on utilise systématiquement le tamisage moléculaire par colonne microspin S400HR, on doit tout d'abord vérifier que le titre viral n'est pas modifié par rétention éventuelle de particules virales ; sachant que le titre de la suspension virale témoin en log DCIT<sub>50</sub> avant passage sur colonne est de 7,70 (lot 1). Les essais ont été menés avec 2 lots distincts de production virale dont le second lot a un titre de 7,60 (lot 2).

| Condition testée                                   | Substances Interférentes | Titre de virus en log DCIT <sub>50</sub> | Différence de titre viral en log DCIT <sub>50</sub> |
|--|--------------------------|--|---|
| Suspension virale lot 1 + colonne Microspin S400HR | 3,0 g/L BSA+sang         | 7,7                                      | <b>0</b>  |
| Suspension virale lot 2 + colonne Microspin S400HR | 3,0 g/L BSA+sang         | 7,6                                      | <b>0</b>  |

Ensuite, l'arrêt de l'activité du produit ENZYME X P est faite dans la glace fondante. Le titre de la suspension virale témoin après passage sur colonne en log DCIT<sub>50</sub> est de 7,7 et de 7,6.

| Condition testée   | Substances Interférentes | Titre de virus en log DCIT <sub>50</sub> | Différence de titre viral en log DCIT <sub>50</sub> |
|--|--------------------------|--|---|
| ENZYMEX P 0,5% dans la glace 30 min + colonne Microspin S400HR | 3,0 g/L BSA+sang         | Lot 1 : 7,7<br>Lot 2 : 7,6               | <b>0,0</b>  |

Ainsi d'une part le titre viral reste inchangé après passage sur colonne (différence < à 0,5 log) et d'autre part le filtrat du produit ne possède plus d'activité virucide (différence < à 0,5 log ; l'arrêt de l'activité de l'ENZYMEX P a bien été efficace en bain de glace fondante).

### 3.4. Essais d'inactivation de référence

L'essai est réalisé seulement avec le lot 1 de production virale dont le titre en log DCIT<sub>50</sub> est de 7,7.

| Conditions testées en présence de formaldéhyde 1,4% | Titre de virus en log DCIT <sub>50</sub> | Réduction du titre viral en log DCIT <sub>50</sub> |
|---|--|--|
| Cytotoxicité  | 7,000                                    | 0,700  |
| Essai d'inactivation 30 min                         | 6,300                                    | 1,400  |
| Essai d'inactivation 60 min                         | 5,400                                    | 2,300  |

Lors de l'évaluation de l'effet cytotoxique du formaldéhyde, la réduction du titre viral est de 0,7 log. La validation est effective si la réduction du titre viral n'excède pas 1 log.

La suspension soumise au formaldéhyde après 30 minutes voit son titre viral diminué de 1,4 log et de 2,3 log après 60 min. Sachant que le titre ne doit pas diminuer de plus de 2 log après 30 minutes et de plus de 2,5 log après 60 minutes, les conditions de la norme sont remplies.

## 4. Essais proprement dits-calcul de l'activité virucide

### 4.1. Essai ENZYMEX P 0.5% 5 minutes 20°C

#### 4.1.1. Production virale lot 1

Un essai est réalisé sur le lot 1 de suspension virale dont le titre initial est de 7,7 log DCIT<sub>50</sub>.

| Produit   | Concentration (v/v) | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai en log DCIT <sub>50</sub> | Réduction du titre viral |
|-----------|---------------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| ENZYMEX P | 0,5%                | 5 minutes        | 20°C                   | < 3,5                                       | > 4,2                    |

#### 4.1.2 Production virale lot 2

Un autre essai est réalisé sur le lot 2 de suspension virale dont le titre initial est de 7,6 log DCIT<sub>50</sub>.

| Produit   | Concentration (v/v) | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai en log DCIT <sub>50</sub> | Réduction du titre viral |
|-----------|---------------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| ENZYMEX P | 0,5%                | 5 minutes        | 20°C                   | < 3,5                                       | > 4,1                    |

Compte tenu de la préparation de la solution test et des dilutions nécessaires, on ne peut pas savoir ce qui se passe avant la 1ère dilution passée sur colonne (10<sup>-3</sup>) d'où le signe < 3,5.

Est virucide la concentration qui entraîne une réduction du titre viral d'au moins 4 logs. La condition testée sur les deux productions virales est donc virucide.

#### 4.2. Essai ENZYMEX P 0.5% 10 minutes 20°C

##### 4.2.1 Production virale lot 1

Un essai est réalisé sur le lot 1 de suspension virale dont le titre initial est de 7,7 log DCIT<sub>50</sub>.

| Produit   | Concentration (v/v) | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai en log DCIT <sub>50</sub> | Réduction du titre viral |
|-----------|---------------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| ENZYMEX P | 0,5%                | 10 minutes       | 20°C                   | < 3,5                                       | > 4,2                    |

#### 4.2.2. Production virale lot 2

Un autre essai est réalisé sur le lot 2 de suspension virale dont le titre initial est de 7,6 log DCIT<sub>50</sub>.

| Produit   | Concentration (v/v) | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai en log DCIT <sub>50</sub> | Réduction du titre viral |
|-----------|---------------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| ENZYMEX P | 0,5%                | 10 minutes       | 20°C                   | < 3,5                                       | > 4,1                    |

Compte tenu de la préparation de la solution test et des dilutions nécessaires, on ne peut pas savoir ce qui se passe avant la 1ère dilution passée sur colonne (10<sup>-3</sup>) d'où le signe < 3,5.

Est virucide la concentration qui entraîne une réduction du titre viral d'au moins 4 logs. La condition testée ici est donc virucide au cours des deux essais.

#### 4.3. Essai ENZYMEX P 0.5% 15 minutes 20°C

##### 4.3.1. Production virale lot 1

Un essai est réalisé sur le lot 1 de suspension virale dont le titre initial est de 7,7 log DCIT<sub>50</sub>.

| Produit   | Concentration (v/v) | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai en log DCIT <sub>50</sub> | Réduction du titre viral |
|-----------|---------------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| ENZYMEX P | 0,5%                | 15minutes        | 20°C                   | <3,5  | > 4,2                    |

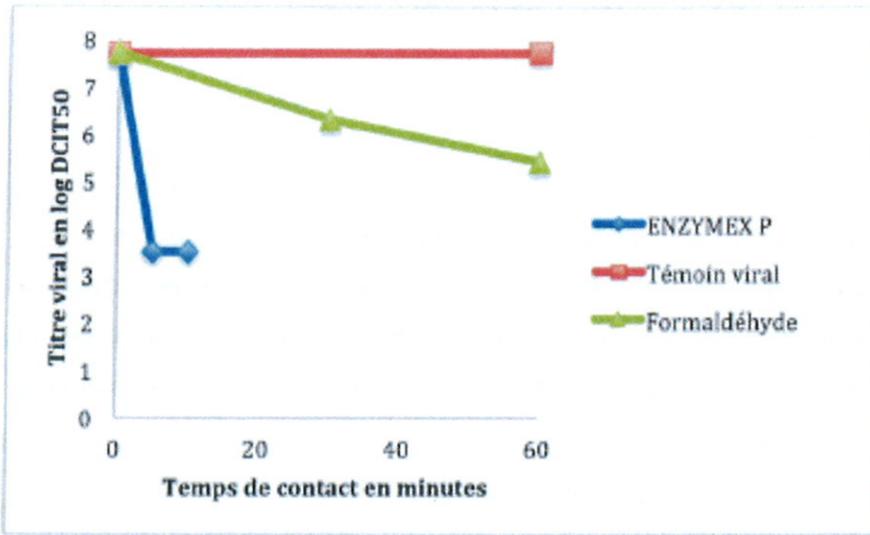


Figure : illustration graphique de l'évolution logarithmique du titre viral (lot 1) du Pseudorabies Virus (PrV) après le traitement par l'ENZYMEX P en comparaison au formaldéhyde et au témoin de suspensions virale non traité.

#### 4.3.2. Production virale lot 2

Un autre essai est réalisé sur le lot 2 de suspension virale dont le titre initial est de 7,6 log DCIT<sub>50</sub>.

| Produit   | Concentration (v/v) | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai en log DCIT <sub>50</sub> | Réduction du titre viral |
|-----------|---------------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| ENZYMEX P | 0,5%                | 15 minutes       | 20°C                   | < 3,5                                       | > 4,1                    |

Compte tenu de la préparation de la solution test et des dilutions nécessaires, on ne peut pas savoir ce qui se passe avant la 1<sup>ère</sup> dilution passée sur colonne (10-3) d'où le signe < 3,5.

Est virucide la concentration qui entraîne une réduction du titre viral d'au moins 4 logs.

La condition testée ici est donc virucide au cours des deux essais.

## 5. Vérification de la méthodologie

Les essais réalisés satisfont aux critères de validation car :

- le titre de la suspension virale d'essai est suffisant pour permettre une observation de réduction d'au moins 4 logs après essai ; il est dans cette étude de 7,7 et de 7,6 log DCIT<sub>50</sub> pour le Pseudorabies Virus (PrV) dans deux productions virales distinctes.
- La différence des titres entre le témoin viral et le virus de référence lors de l'essai de l'inactivation par le formaldéhyde est inférieure à 2 log après 30 minutes et inférieure à 2,5 log après 60 minutes
- Le produit testé n'affecte pas significativement la morphologie des cellules
- Les conditions en saleté (3,0 g/L BSA et 3,0 mL/L érythrocytes) n'affectent pas l'infectivité du virus
- Le produit testé ENZYME X P ne réduit pas la sensibilité des cellules PK15 au Pseudorabies Virus (PrV). La différence est de 0,1 log (la norme demande < 1,0 log).
- L'utilisation de la colonne microspin S400HR n'influence pas sur le titre viral. La différence est de 0 log (la norme demande < 0,5 log).

## 6. Conclusion

Les essais réalisés ont démontré que l'ENZYME X P à 0,5% dès 5 minutes à 20°C en condition de saleté, a une activité virucide sur le Pseudorabies Virus (PrV) (ATCC-VR-2 107) selon la méthodologie de la norme EN 14476 (2013).

## RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE DU  
PRODUIT F010436V6 SELON LA NORME EN 14476**

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du: 18/10/2018

Références du dossier d'analyses: n°268D25-2018-17

### 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 1 souche de référence: *pseudo rabies virus PRV* (virus modèle du virus de l'hépatite B).

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

Date d'émission : 11/12/2018

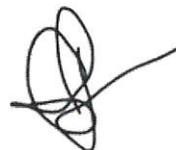
Stéphanie MOROT-BIZOT  
Docteur en microbiologie  
Chargée de l'étude

Professeur Georges HERBEIN  
Professeur des Universités Praticien Hospitalier  
Expert scientifique



**APEX BIOSOLUTIONS**  
4, rue des grandes pièces  
25770 Serre les sapins

tél 09 62 52 91 87 - info@apexlabo.com  
n° SIRET 517 860 532 00012  
n° TVA intra FR 2351 7860532



**SOMMAIRE**

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS .....3

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS .....3

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES .....3

4. VALIDATION DE LA METHODE .....4

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

6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE .....5

7. CONCLUSION .....6

8. ANNEXE 1 .....7

9. ANNEXE 2 .....8

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

**1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS**

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

**2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS**

| Echantillon | N° lot |
|-------------|--------|
| F010436V6   | 5411   |

- 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 : poudre blanche
- Précautions d'emploi : aucune
- Diluant préconisé par le fabricant : eau potable, eau potable, 1 dose de 20 g dans 5 L d'eau
- Date de réception au laboratoire : 24/10/2018
- Période de l'étude : du 02/11/2018 au 05/12/2018

**3. CONDITIONS EXPERIMENTALES**

- Température d'essai: 20°C ± 1°C
- Méthode de titrage: virus titré en log DICT<sub>50</sub>
- Temps de contact: 5 min, 10 min et 15 min
- Concentration cible: 0.4%
- Diluant du produit utilisé lors des essais: eau dure
- Souche de virus testée: PRV virus, cultivé sur cellules VERO, à 37°C, sous 5% CO<sub>2</sub>
- 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 PRV (calculé selon la méthode de Spearman-Kärber) = 6,500 log DICT<sub>50</sub>.

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

Ev. - F010436V6 02/11/18

#### 4. VALIDATION DE LA METHODE

##### a) Méthodologie

Le produit **F010436V6** a été testé sur des cultures de cellules VERO et une légère 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 <sub>50</sub> )    |   |   |
|------------------|-----------|---|---|---|
|                  |           | Suspension virale sur cellules non traitées | Suspension virale sur cellules traitées | Différence de titre viral (log DICT <sub>50</sub> ) |
| <b>F010436V6</b> | $10^{-2}$ | 6,500                                       | 6,125                                   | <b>0,375</b>  |

La différence de titre viral doit être inférieure à 1,0 log. Le produit F010436V6 testé à la concentration indiquée ci-dessus ne montre pas d'influence sur la méthode de titrage du PRV.

##### c) Validations de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit F010436V6 :

| Concentration du produit | Substances interférentes                                     | Titre de virus (log DICT <sub>50</sub> ) | Différence avec la suspension virale d'essai |
|--------------------------|--|--|--|
| <b>F010436V6</b> 0.4 %   | 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 DICT <sub>50</sub> ) | Réduction du titre viral (log DICT <sub>50</sub> ) |
|------------------------------------|--|--|
| <b>Suspension virale témoin</b>    | 6,500                                    |  |
| <b>En formaldéhyde 0,7%</b>        |  |  |
| Essai d'inactivation 5 min         | 6,500                                    | 0,000  |
| Essai d'inactivation 15 min        | 6,000                                    | 0,500  |
| <b>Essai d'inactivation 30 min</b> | 5,250                                    | <b>1,250</b>                                       |

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 1,250 log après 30 min et les conditions de la norme sont donc remplies.

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

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

### Essai 1

La suspension virale témoin a une concentration de  $6,500 \log \text{DICT}_{50}$ .

| PRODUIT          | Concentration (v/v) | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai (log $\text{DICT}_{50}$ ) | Réduction du titre viral |
|------------------|---------------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| <b>F010436V6</b> | 0.4%                | 5 min            | 20°C                   | 3,500                                       | 3,000                    |
|                  |                     | 10 min           |                        | 2,750                                       | 3,750                    |
|                  |                     | 15 min           |                        | 2,125                                       | <b>4,375</b>             |

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  $6,500 \log \text{DICT}_{50}$ .

| PRODUIT          | Concentration (v/v) | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai (log $\text{DICT}_{50}$ ) | Réduction du titre viral |
|------------------|---------------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| <b>F010436V6</b> | 0.4%                | 5 min            | 20°C                   | 3,500                                       | 3,000                    |
|                  |                     | 10 min           |                        | 3,000                                       | 3,500                    |
|                  |                     | 15 min           |                        | 2,250                                       | <b>4,250</b>             |

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  $6,500 \log \text{DICT}_{50}$  pour le PRV.
- 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 1,250 logs après 30 min d'inactivation par le formaldéhyde pour le PRV.
- 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

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

- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité des cellules au virus PRV. 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 F010436V6 est inférieure à 0,5 log (0,000 log DICT<sub>50</sub> essai 1 et 0,000 log DICT<sub>50</sub> essai 2)

## 7. CONCLUSION

### Les essais réalisés sur le produit F010436V6 lot n° 5411 ont démontré :

- que le produit **F010436V6** employé à **0.4%**, a une activité virucide sur le virus modèle PRV du virus de l'hépatite B selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A1, pour 15 minutes de contact à 20°C, en conditions de saleté.

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

**8. ANNEXE 1**

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

**Souche virale:** virus PRV (lot n° 3/2091233/151812- Friedrich Loeffler Institut)

**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

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

## 9. ANNEXE 2

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

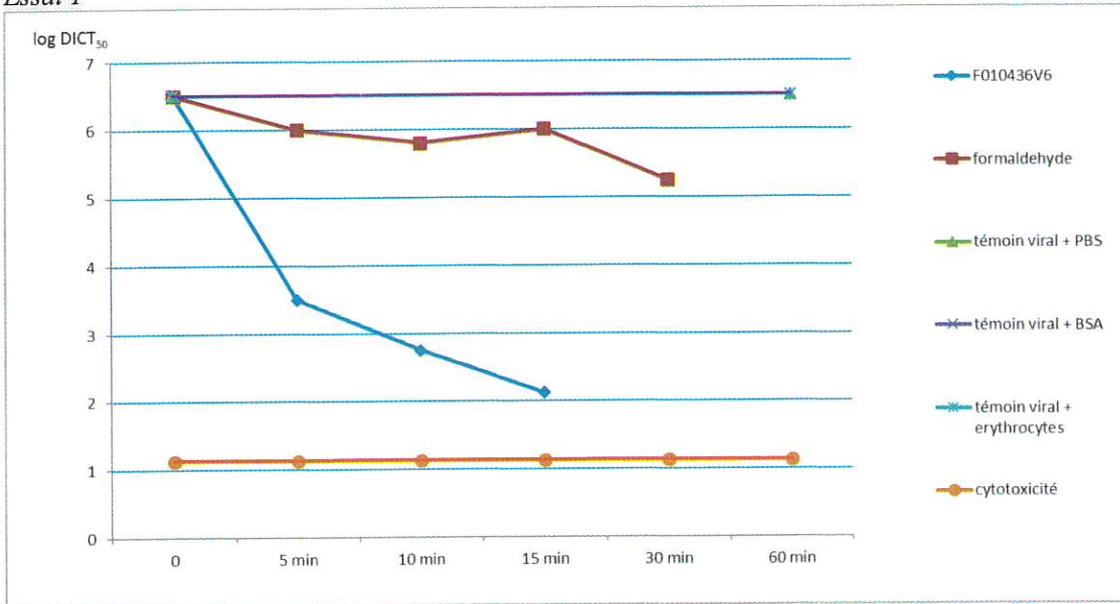
$\log \text{DICT}_{50} = 6,500$

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

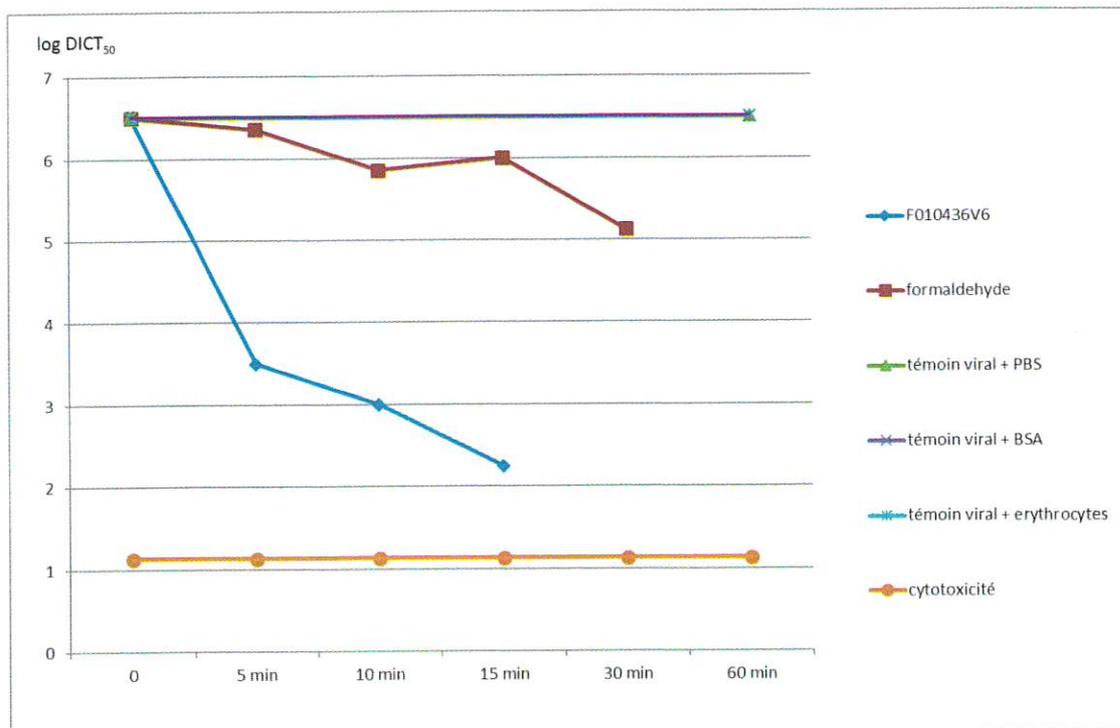
| <b>Rédacteur</b>  | <b>Superviseur</b>  |
|---|---|
| Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire                                     | Mme Stephanie MOROT-BIZOT, directrice   |
|  |  |

a) Figure 1 – représentations graphiques des résultats des essais :

Essai 1



Essai 2



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

b) Tableau A2 — Tableau des résultats du produit F010436V6 et du PRV dans des conditions de saleté (3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes)

| Produit                              | Concentration    | Substance interférente                | Niveau de cytotoxicité   | L <sub>g</sub> DICT <sub>50</sub> |       |        |        |        |        | Réduction           |
|--------------------------------------|------------------|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|---------------------|
|                                      |                  |                                       |                          | 0                                 | 5 min | 10 min | 15 min | 30 min | 60 min |                     |
| F010436V6<br>essai 1                 | 0,40%            | 3 g/l BSA +<br>3 ml/l<br>érythrocytes | 1,125                    | 6,500                             | 3,500 | 2,750  | 2,125  | N.T.   | N.T.   | 15 min<br>R = 4,375 |
| F010436V6<br>essai 2                 | 0,40%            | 3 g/l BSA +<br>3 ml/l<br>érythrocytes | 1,125                    | 6,500                             | 3,500 | 3,000  | 2,250  | N.T.   | N.T.   | 15 min<br>R = 4,250 |
| Formaldéhyde<br>Essai 1              | 0,70%            | PBS                                   | 2,250                    | 6,500                             | 6,500 | N.T.   | 6,000  | 5,250  | N.T.   |                     |
| Formaldéhyde<br>Essai 2              | 0,70%            | PBS                                   | 2,125                    | 6,500                             | 6,750 | N.T.   | 6,000  | 5,125  | N.T.   |                     |
| Témoin<br>infectivité<br>Essai 1     | N.A.             | PBS                                   | N.A.                     | 6,500                             | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 6,500  |                     |
| Témoin<br>infectivité<br>Essai 1     | N.A.             | 3 g/l BSA                             | N.A.                     | 6,500                             | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 6,500  |                     |
| Témoin<br>infectivité<br>Essai 1     | N.A.             | 3 g/l BSA +<br>3 ml/l<br>érythrocytes | N.A.                     | 6,500                             | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 6,500  |                     |
| Témoin<br>infectivité<br>Essai 2     | N.A.             | PBS                                   | N.A.                     | 6,500                             | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 6,500  |                     |
| Témoin<br>infectivité<br>Essai 2     | N.A.             | 3 g/l BSA                             | N.A.                     | 6,500                             | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 6,500  |                     |
| Témoin<br>infectivité<br>Essai 2     | N.A.             | 3 g/l BSA +<br>3 ml/l<br>érythrocytes | N.A.                     | 6,500                             | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 6,500  |                     |
| Sensibilité des<br>cellules au virus | 10 <sup>-2</sup> | N.A.                                  | Cellules<br>non traitées | 6,500                             |       |        |        |        |        |                     |
|                                      |                  | N.A.                                  | Cellules<br>traitées     | 6,125                             |       |        |        |        |        |                     |

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

c) Tableau A3 — Données brutes pour le produit F010436V6 avec 3 g/L BSA + 3 mL érythrocytes soumis à essai contre le PRV (titrage par effet cytopathique ; 8 puits)

*Essai 1*

|   | Concentration | Substance interférente        | Temps de contact | Dilutions   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---|---------------|-------------------------------|------------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|   |               |                               |                  | -1  | -2   | -3   | -4   | -5   | -6   | -7   | -8   | -9   |      |
| <b>F010436V6</b>  | 0,4%          | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 5 min            | 4444  | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|   |               |                               |                  | 4444  | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|   |               |                               | 10 min           | 4444  | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|   |               |                               |                  | 4444  | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|   |               |                               | 15 min           | 4444  | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|   |               |                               |                  | 4444  | 4000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| Témoin viral  | 4444          | 4444                          | 4444             | 4444  | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |      |
|   | 4444          | 4444                          | 4444             | 4444  | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |      |
| <b>F010436V6 cytotoxicité</b>   | 0,4%          | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | N.A.             | 4444  | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|   |               |                               |                  | 4000  | 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 | 1111 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|   |               |                               |                  | 4444  | 4444 | 4444 | 1111 | 1100 | 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 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|   |               |                               |                  | 4444  | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| 60  | 4444          | 4444                          | 4444             | 4444  | 4444 | 4444 | 0000 | 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 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|   |               |                               |                  | 4444  | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| 60  | 4444          | 4444                          | 4444             | 4444  | 4444 | 4444 | 0000 | 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 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|   |               |                               |                  | 4444  | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| 60  | 4444          | 4444                          | 4444             | 4444  | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |      |      |
|   | 4444          | 4444                          | 4444             | 4444  | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |      |      |
| <b>Rédacteur</b>  |               |                               |                  | <b>Superviseur</b>  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire                                     |               |                               |                  | Mme Stephanie MOROT-BIZOT, directrice   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|  |               |                               |                  |  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |

Essai 2

|                               | Concentration | Substance interférente        | Temps de contact | Dilutions |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------------|---------------|-------------------------------|------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                               |               |                               |                  | -1        | -2   | -3   | -4   | -5   | -6   | -7   | -8   | -9   |      |
| <b>F010436V6</b>              | 0,4%          | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 5 min            | 4444      | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                               |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                               |               |                               | 10 min           | 4444      | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                               |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| 15 min                        | 4444          | 4444                          | 0000             | 0000      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |      |
|                               | 4444          | 4400                          | 0000             | 0000      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |      |
| Témoin viral                  |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                               |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| <b>F010436V6 cytotoxicité</b> | 0,4%          | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | N.A.             | 4444      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                               |               |                               |                  | 4000      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| Formaldéhyde                  | 0,70%         | PBS                           | 5                | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4400 | 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 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                               |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 1000 | 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 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                               |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| 60                            |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 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 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                               |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| 60                            |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 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 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                               |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| 60                            |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                               |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |

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

d) Sensibilité des cellules au virus :

| Produit          | Dilution         | Substance interférente        |                       | Dilutions |      |      |      |      |      |      |      |
|------------------|------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|
|                  |                  |                               |                       | -2        | -3   | -4   | -5   | -6   | -7   | -8   | -9   |
| <b>F010436V6</b> | 10 <sup>-2</sup> | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | Cellules non traitées | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                  |                  |                               |                       | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                  |                  |                               | Cellules traitées     | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                  |                  |                               |                       | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4000 | 0000 | 0000 | 0000 |

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



## RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE DU  
PRODUIT F010436V6 SELON LA NORME EN 14476**

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du: 18/10/2018

Références du dossier d'analyses: n°268D25-2018-16

### 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 1 souche de référence: *herpes simplex virus*.

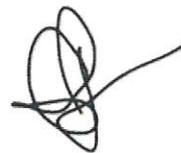
Ce rapport comporte 13 pages et ne concerne que les échantillons étudiés.

Date d'émission : 11/12/2018

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



Professeur Georges HERBEIN  
Professeur des Universités Praticien Hospitalier  
Expert scientifique



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

**SOMMAIRE**

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS ..... 3

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS ..... 3

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES ..... 3

4. VALIDATION DE LA METHODE ..... 4

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

6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE ..... 5

7. CONCLUSION ..... 6

8. ANNEXE 1 ..... 7

9. ANNEXE 2 ..... 8

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

**1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS**

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

**2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS**

| Echantillon      | N° lot |
|------------------|--------|
| <b>F010436V6</b> | 5411   |

- 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 : poudre blanche
- Précautions d'emploi : aucune
- Diluant préconisé par le fabricant : eau potable, 1 dose de 20 g dans 5 L d'eau
- Date de réception au laboratoire : 24/10/2018
- Période de l'étude : du 02/11/2018 au 05/12/2018

**3. CONDITIONS EXPERIMENTALES**

- Température d'essai: 20°C ± 1°C
- Méthode de titrage: virus titré en log DICT<sub>50</sub>
- Temps de contact: 5 min, 10 min et 15 min
- Concentration cible: 0.4%
- Diluant du produit utilisé lors des essais: eau dure
- Souche de virus testée: herpès virus type 1, cultivé sur cellules VERO, à 37°C, sous 5% CO<sub>2</sub>
- 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 de l'herpès (calculé selon la méthode de Spearman-Kärber) = 7,500 log DICT<sub>50</sub>.

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

#### 4. VALIDATION DE LA METHODE

##### a) Méthodologie

Le produit **F010436V6** a été testé sur des cultures de cellules VERO et une légère 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 <sub>50</sub> )    |   |   |
|-----------------------------------|---|---|---|
|                                   | Suspension virale sur cellules non traitées | Suspension virale sur cellules traitées | Différence de titre viral (log DICT <sub>50</sub> ) |
| <b>F010436V6</b> 10 <sup>-2</sup> | 7,500                                       | 7,000                                   | <b>0,500</b>  |

La différence de titre viral doit être inférieure à 1,0 log. Le produit F010436V6 testé à la concentration indiquée ci-dessus ne montre pas d'influence sur la méthode de titrage de l'herpès virus.

##### c) Validations de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit F010436V6 :

| Concentration du produit | Substances interférentes                                     | Titre de virus (log DICT <sub>50</sub> ) | Différence avec la suspension virale d'essai |
|--------------------------|--|--|--|
| <b>F010436V6</b> 0.4 %   | 3 g/L de sérum albumine bovine + 3 mL érythrocytes de mouton | Essai 1: 7,500                           | 0,000  |
|                          |  | Essai 2: 7,500                           | 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 DICT <sub>50</sub> ) | Réduction du titre viral (log DICT <sub>50</sub> ) |
|------------------------------------|--|--|
| <b>Suspension virale témoin</b>    | 7,500                                    |  |
| <b>En formaldéhyde 0,7%</b>        |  |  |
| Essai d'inactivation 5 min         | 7,000                                    | 0,500  |
| Essai d'inactivation 15 min        | 6,250                                    | 1,250  |
| <b>Essai d'inactivation 30 min</b> | 5,500                                    | <b>2,000</b>                                       |

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 2,00 log après 30 min et les conditions de la norme sont donc remplies.

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

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

### Essai 1

La suspension virale témoin a une concentration de  $7,500 \log \text{DICT}_{50}$ .

| PRODUIT          | Concentration (v/v) | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai (log $\text{DICT}_{50}$ ) | Réduction du titre viral |
|------------------|---------------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| <b>F010436V6</b> | 0.4%                | 5 min            | 20°C                   | 4,125                                       | 3,375                    |
|                  |                     | 10 min           |                        | 3,375                                       | <b>4,125</b>             |
|                  |                     | 15 min           |                        | 3,000                                       | <b>4,500</b>             |

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  $7,500 \log \text{DICT}_{50}$ .

| PRODUIT          | Concentration (v/v) | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai (log $\text{DICT}_{50}$ ) | Réduction du titre viral |
|------------------|---------------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| <b>F010436V6</b> | 0.4%                | 5min             | 20°C                   | 4,250                                       | 3,250                    |
|                  |                     | 10 min           |                        | 3,500                                       | <b>4,000</b>             |
|                  |                     | 15 min           |                        | 3,000                                       | <b>4,500</b>             |

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  $7,500 \log \text{DICT}_{50}$  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 2,000 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 saleté (3 g/L de sérum albumine bovine + 3 mL érythrocytes de mouton) n'affectent pas l'infectivité du virus

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

- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité des cellules à l'herpès virus. 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 F010436V6 est inférieure à 0,5 log (0,000 log DICT<sub>50</sub> essai 1 et 0,000 log DICT<sub>50</sub> essai 2)

## 7. CONCLUSION

### Les essais réalisés sur le produit F010436V6 lot n° 5411 ont démontré:

- que le produit **F010436V6 employé à 0.4%, a une activité virucide sur l'herpès virus** selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A1, **pour 10 minutes de contact à 20°C, en conditions de saleté.**

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

**8. ANNEXE 1**

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

**Souche virale:** herpès virus type 1 (ATCC réf. 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
- 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, Oxoid, réf. SR 0051E, lot n° 4234000

**Solution d'inactivation:**

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

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

## 9. ANNEXE 2

Tableau A1 - Titration de l'herpès virus par effet cytopathique, par la méthode de calcul Spearman-Kärber :

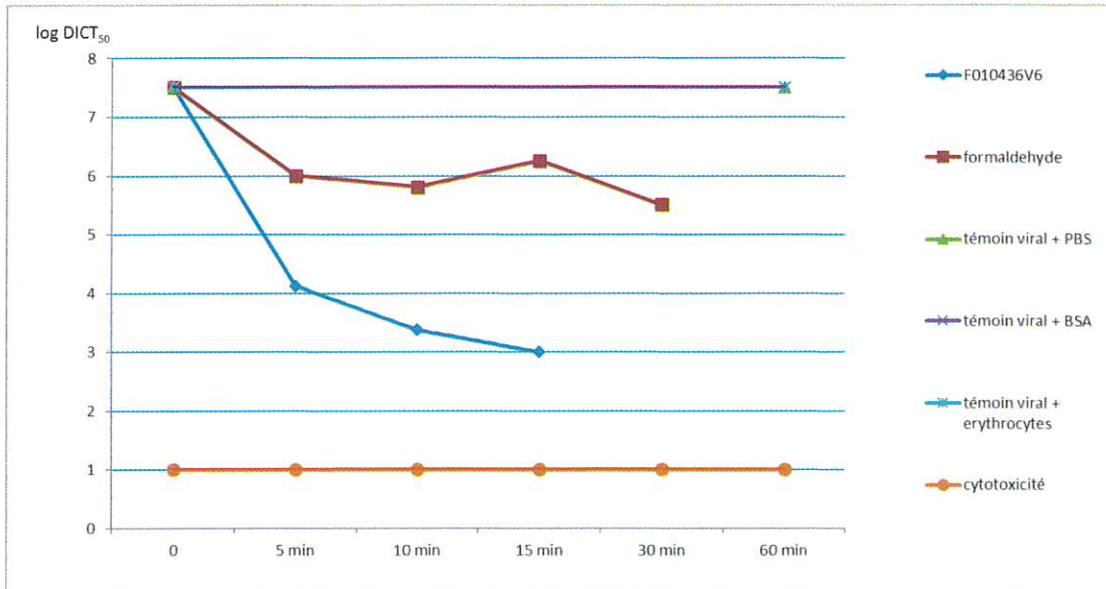
$\log \text{DICT}_{50} = 7,500$

| Dilution (- log)                  | Résultat | % résultats positifs |
|-----------------------------------|----------|----------------------|
| -3                                | 44444444 | 100                  |
| -4                                | 44444444 | 100                  |
| -5                                | 44444444 | 100                  |
| -6                                | 44444444 | 100                  |
| -7                                | 11111111 | 100                  |
| -8                                | 00000000 | 0                    |
| -9                                | 00000000 | 0                    |
| -10                               | 00000000 | 0                    |
| Somme des % de cultures positives |          | 500,0                |

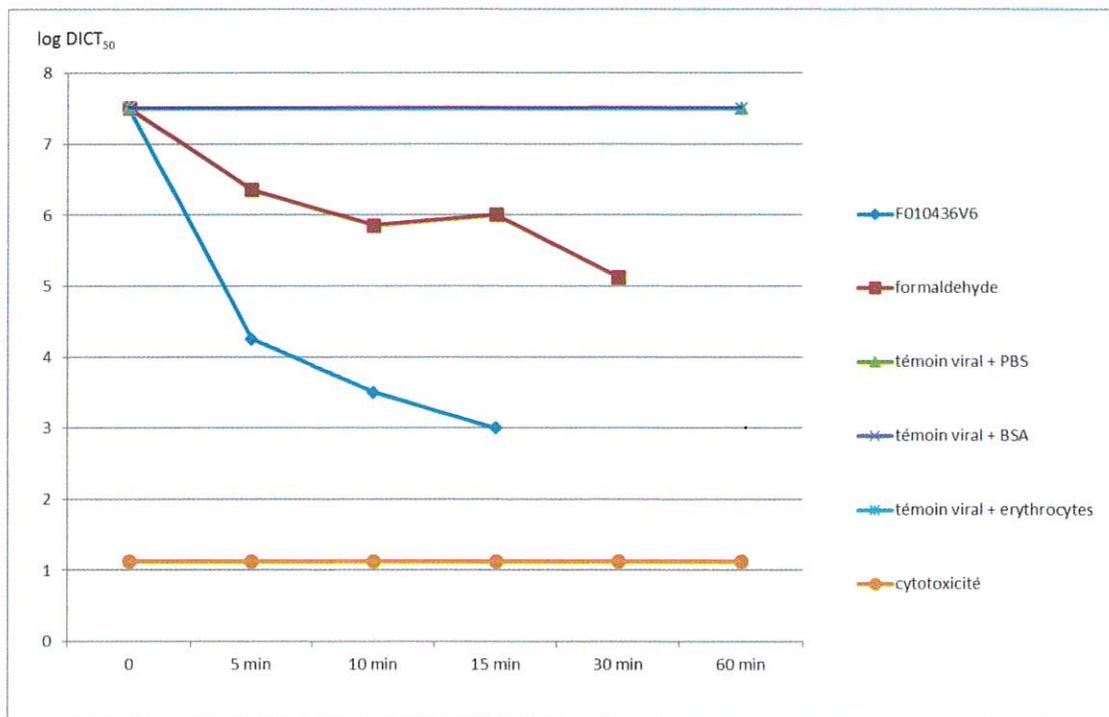
| <b>Rédacteur</b>  | <b>Superviseur</b>  |
|---|---|
| Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire                                     | Mme Stephanie MOROT-BIZOT, directrice   |
|  |  |

a) Figure 1 – représentations graphiques des résultats des essais :

*Essai 1*



*Essai 2*



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

b) Tableau A2 — Tableau des résultats du produit F010436V6 et de l'herpès virus dans des conditions de saleté (3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes)

| Produit                              | Concentration    | Substance interférente             | Niveau de cytotoxicité   | Lg DICT <sub>50</sub> |       |        |        |        |        | Réduction           |
|--------------------------------------|------------------|------------------------------------|--------------------------|-----------------------|-------|--------|--------|--------|--------|---------------------|
|                                      |                  |                                    |                          | 0                     | 5 min | 10 min | 15 min | 30 min | 60 min |                     |
| F010436V6<br>essai 1                 | 0,40%            | 3 g/l BSA +<br>3 ml/l érythrocytes | 1,000                    | 7,500                 | 4,125 | 3,375  | 3,000  | N.T.   | N.T.   | 10 min<br>R = 4,125 |
| F010436V6<br>essai 2                 | 0,40%            | 3 g/l BSA +<br>3 ml/l érythrocytes | 1,125                    | 7,500                 | 4,250 | 3,500  | 3,000  | N.T.   | N.T.   | 10 min<br>R = 4,000 |
| Formaldéhyde<br>Essai 1              | 0,70%            | PBS                                | 2,375                    | 7,500                 | 7,000 | N.T.   | 6,250  | 5,500  | N.T.   |                     |
| Formaldéhyde<br>Essai 2              | 0,70%            | PBS                                | 2,375                    | 7,500                 | 6,750 | N.T.   | 6,000  | 5,125  | N.T.   |                     |
| Témoin infectivité<br>Essai 1        | N.A.             | PBS                                | N.A.                     | 7,500                 | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 7,500  |                     |
| Témoin infectivité<br>Essai 1        | N.A.             | 3 g/l BSA                          | N.A.                     | 7,500                 | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 7,500  |                     |
| Témoin infectivité<br>Essai 1        | N.A.             | 3 g/l BSA +<br>3 ml/l érythrocytes | N.A.                     | 7,500                 | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 7,500  |                     |
| Témoin infectivité<br>Essai 2        | N.A.             | PBS                                | N.A.                     | 7,500                 | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 7,500  |                     |
| Témoin infectivité<br>Essai 2        | N.A.             | 3 g/l BSA                          | N.A.                     | 7,500                 | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 7,500  |                     |
| Témoin infectivité<br>Essai 2        | N.A.             | 3 g/l BSA +<br>3 ml/l érythrocytes | N.A.                     | 7,500                 | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 7,500  |                     |
| Sensibilité des<br>cellules au virus | 10 <sup>-2</sup> | N.A.                               | Cellules<br>non traitées | 7,500                 |       |        |        |        |        |                     |
|                                      |                  | N.A.                               | Cellules<br>traitées     | 7,000                 |       |        |        |        |        |                     |

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

- c) Tableau A3 — Données brutes pour le produit F010436V6 avec 3 g/L BSA + 3 mL érythrocytes soumis à essai contre l'herpès virus (titrage par effet cytopathique : 8 puits)

*Essai 1*

|   | Concentration | Substance interférente           | Temps de contact  | Dilutions |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---|---------------|----------------------------------|---|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|   |               |                                  |   | -1        | -2   | -3   | -4   | -5   | -6   | -7   | -8   | -9   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <b>F1031V2</b>  | 100,00%       | 3 g/l BSA +<br>3 ml érythrocytes | 5 min   | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |
|   |               |                                  |   | 4444      | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4440 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |
|   |               |                                  | 10 min  | 4444      | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |
|   |               |                                  |   | 4444      | 4444 | 4440 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |
|   |               |                                  | 15 min  | 4444      | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |
|   |               |                                  |   | 4444      | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |
| Témoin viral  |               |                                  |   | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 |      |
|   |               |                                  |   | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 |
| <b>F1031V2</b><br>cytotoxicité  | 100,00%       | 3 g/l BSA +<br>3 ml érythrocytes | N.A.  | 4444      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |
|   |               |                                  |   | 0000      | 0000 | 0000 | 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 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |      |      |
|   |               |                                  |   | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|   |               |                                  | 15  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|   |               |                                  |   | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 |
|   |               |                                  | 30  | 4444      | 4444 | 4444 | 1111 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|   |               |                                  |   | 4444      | 4444 | 4444 | 1111 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| Formaldéhyde<br>(cytotoxicité)  | 0,70%         | PBS                              | N.A.  | 4444      | 4444 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | 4444 | 4440 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. |      |      |
| Témoin viral<br>infectivité   | N.A.          | PBS                              | 0   | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |      |
|   |               |                                  |   | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |
|   |               |                                  | 60  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |
|   |               |                                  |   | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |
| Témoin viral<br>infectivité   | N.A.          | 3 g/l BSA                        | 0   | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |      |
|   |               |                                  |   | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |
|   |               |                                  | 60  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |
|   |               |                                  |   | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |
| Témoin viral<br>infectivité   | N.A.          | 3 g/l BSA +<br>3 ml érythrocytes | 0   | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |      |
|   |               |                                  |   | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |
|   |               |                                  | 60  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |
|   |               |                                  |   | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |
| <b>Rédacteur</b>  |               |                                  | <b>Superviseur</b>  |           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire                                     |               |                                  | Mme Stephanie MOROT-BIZOT, directrice   |           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|  |               |                                  |  |           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |

Essai 2

|                                | Concentration | Substance interférente        | Temps de contact | Dilutions |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------------|---------------|-------------------------------|------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                                |               |                               |                  | -1        | -2   | -3   | -4   | -5   | -6   | -7   | -8   | -9   |
| <b>F1031V2</b>                 | 100,00%       | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 5 min            | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                                |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                                |               |                               | 10 min           | 4444      | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                                |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                                | 15 min        | 4444                          | 4444             | 4444      | 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 |      |      |
| <b>F1031V2</b><br>cytotoxicité | 100,00%       | 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 |      |
| Formaldéhyde                   | 0,70%         | PBS                           | 5                | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4400 | 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 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                                |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 1000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| Formaldéhyde (cytotoxicité)    | 0,70%         | PBS                           | N.A.             | 4444      | 4444 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. |      |
|                                |               |                               |                  | 4444      | 4440 | 0000 | 0000 | 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 | 4444 | 0000 | 0000 |
|                                |               |                               | 60               | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |
|                                |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 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 | 4444 | 0000 | 0000 |
|                                |               |                               | 60               | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |
|                                |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 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 | 4444 | 0000 | 0000 |
|                                |               |                               | 60               | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |
|                                |               |                               |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |

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

d) Sensibilité des cellules au virus :

| Produit          | dilution         | Substance interférente        |                       | Dilutions |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------------------|------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                  |                  |                               |                       | -2        | -3   | -4   | -5   | -6   | -7   | -8   | -9   |      |
| <b>F010436V6</b> | 10 <sup>-2</sup> | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | Cellules non traitées | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |
|                  |                  |                               |                       | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |      |
|                  |                  |                               | Cellules traitées     | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1000 | 0000 |      |
|                  |                  |                               |                       | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |

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

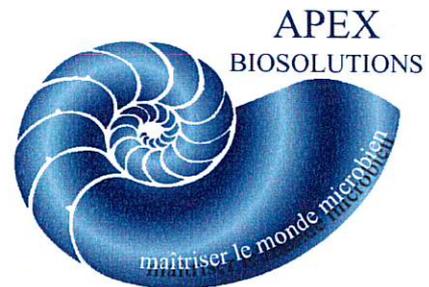


## RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE DU PRODUIT  
F010436V6 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°090D27-2020-01

### 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 PROPREMENT DITS – CALCUL DE L’ACTIVITE VIRUCIDE..... | 5 |
| 6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE.....                        | 5 |
| 7. CONCLUSION.....   | 6 |
| 8. ANNEXE 1.....   | 7 |
| 9. ANNEXE 2.....   | 8 |

| <b>Writer</b>   | <b>Supervisor</b>   |
|---|---|
| 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° |
|-------------|--------|
| F010436V6   | 6459   |

Date limite d'utilisation optimale : non communiquée

Fabricant : FRANKLAB

Date de fabrication : non communiquée

Conditions de stockage : Température ambiante et obscurité.

Substances actives : ammoniums quaternaires

Aspect : poudre blanche

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 DICT<sub>50</sub>
- Temps de contact : 5 min et 15 min
- Concentrations finales: 0,4% et 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% CO<sub>2</sub>
- 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 DICT<sub>50</sub>

| 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 F010436V6 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 <sub>50</sub> ) |   |   |   |
|------------------|--|---|---|---|
|                  | Dilution du produit                      | Suspension virale sur cellules non traitées | Suspension virale sur cellules traitées | Différence de titre viral (log DICT <sub>50</sub> ) |
| <b>F010436V6</b> | $10^{-2}$                                | 6,250                                       | 5,875                                   | <b>0,375</b>  |

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 $\leq 0,5$ log):

| Concentration du produit | Substances interférentes | Titre de virus (log DICT <sub>50</sub> )  | Différence avec la suspension virale d'essai |       |
|--------------------------|--------------------------|---|--|-------|
| <b>F010436V6</b>         | 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 <sub>50</sub> ) | Réduction du titre viral (log DICT <sub>50</sub> ) |
|------------------------------|--|--|
| Suspension virale témoin eau | 6,125                                    |  |
| En glutardialdéhyde 200 ppm  |  |  |
| Essai d'inactivation 5 min   | 1,750                                    | <b>4,375</b>                                       |

La validation des essais est effective si la réduction du titre viral entre la suspension témoin et la suspension soumise au glutardialdéhyde est comprise  $\geq 4$  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 52 min

La suspension virale témoin eau a une concentration de **6,125 log DICT<sub>50</sub>**.

| PRODUIT          | Concentration | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai (log DICT <sub>50</sub> ) | Réduction du titre viral |
|------------------|---------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| <b>F010436V6</b> | 0,5%          | 10 min           | 20°C                   | 1,875                                       | <b>4,250</b>             |
|                  |               | 5 min            |                        | 2,875                                       | 3,250                    |
|                  | 0,4%          | 15 min           |                        | 1,875                                       | <b>4,250</b>             |
|                  |               | 5 min            |                        | 3,125                                       | 3,000                    |

### Essai 2 – séchage 48 min

La suspension virale témoin eau a une concentration de **6,250 log DICT<sub>50</sub>**.

| PRODUIT          | Concentration | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai (log DICT <sub>50</sub> ) | Réduction du titre viral |
|------------------|---------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| <b>F010436V6</b> | 0,5%          | 10 min           | 20°C                   | 1,875                                       | <b>4,375</b>             |
|                  |               | 5 min            |                        | 2,625                                       | 3,625                    |
|                  | 0,4%          | 15 min           |                        | 2,125                                       | <b>4,125</b>             |
|                  |               | 5 min            |                        | 3,375                                       | 2,875                    |

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 DICT<sub>50</sub> 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).

| <b>Writer</b>   | <b>Supervisor</b>   |
|---|---|
| Ms Emilie CANTREL, laboratory technician  | Ms Stephanie MOROT-BIZOT, director  |
|  |  |

## 7. CONCLUSION

### Les essais réalisés sur le produit F010436V6 lot n°6459 ont démontré :

- Que le produit F010436V6, employé dès 0,4% a une activité virucide sur le virus de la vaccine, selon la méthodologie de la norme NF EN 17111 :2018, pour 15 minutes de contact à 20°C, en conditions de saleté.
- Que le produit F010436V6, 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.

| <b>Writer</b>   | <b>Supervisor</b>   |
|---|---|
| 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.

| <b>Writer</b>   | <b>Supervisor</b>   |
|---|---|
| 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 :

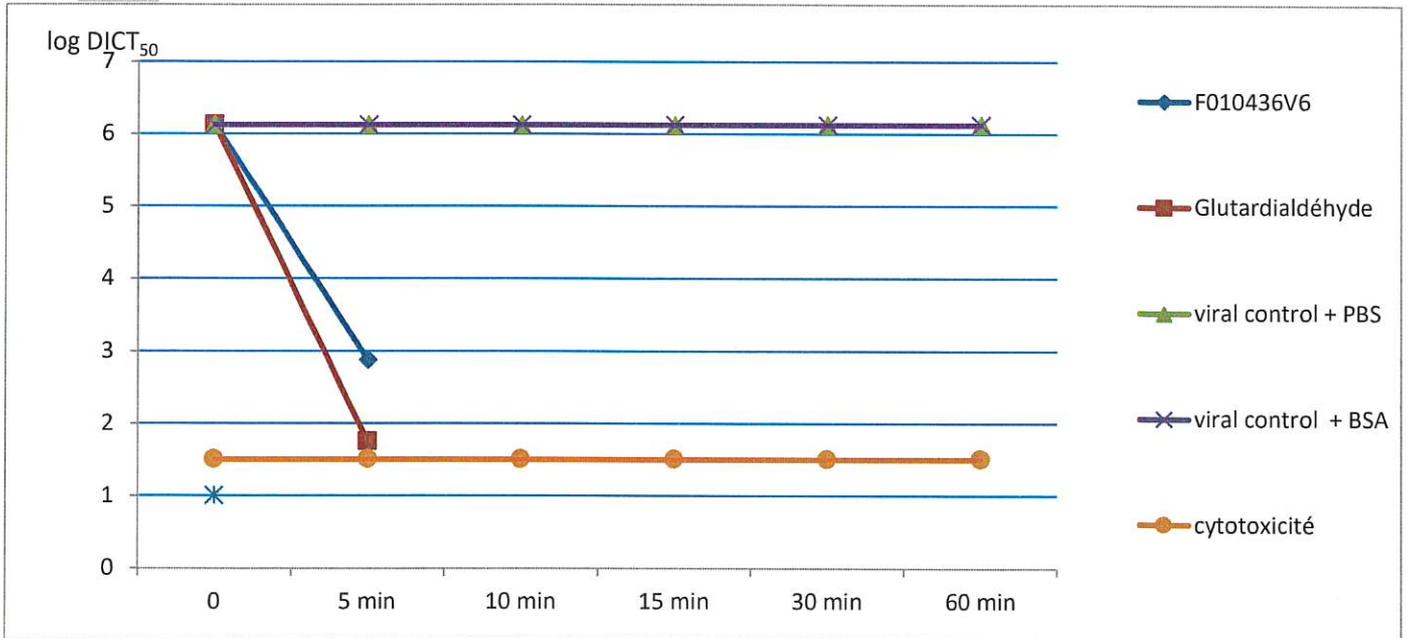
Log DICT<sub>50</sub> = 6,375

| 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                |

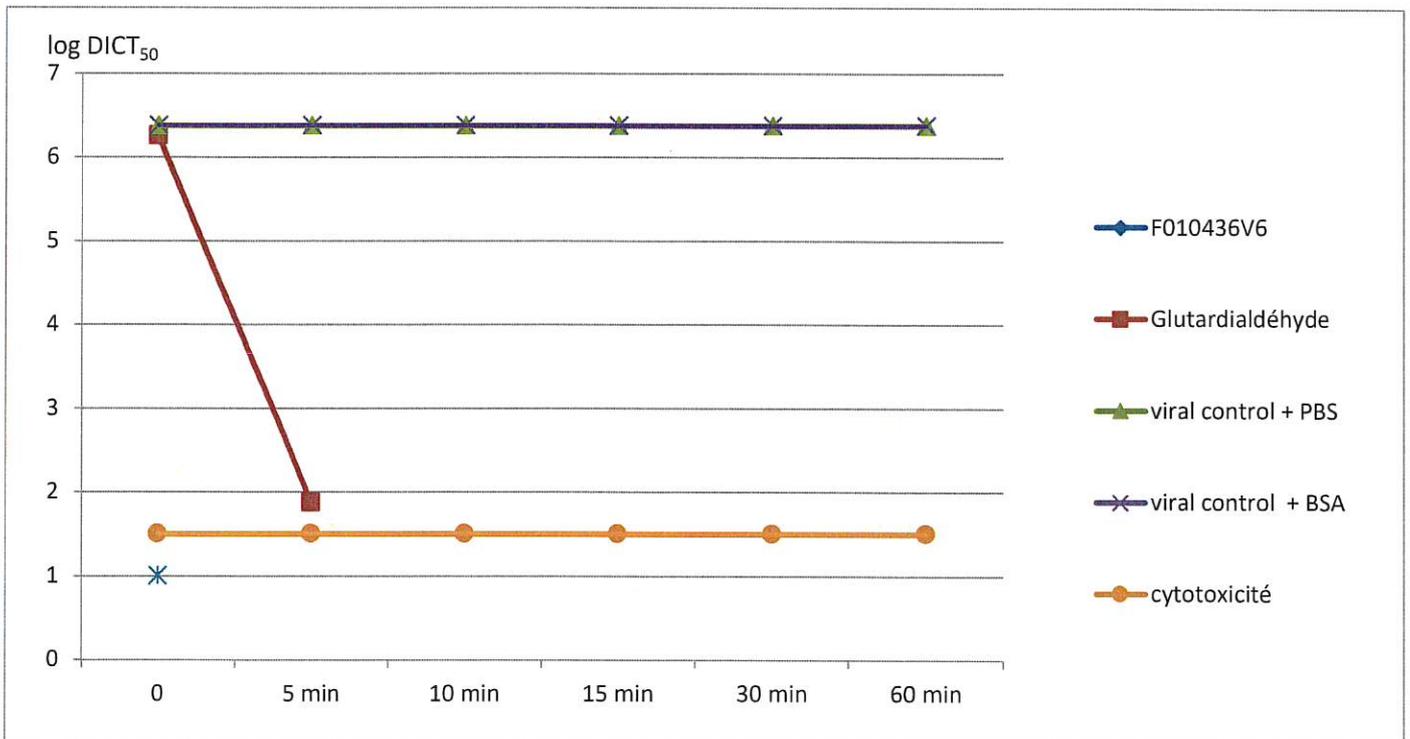
| <b>Writer</b>   | <b>Supervisor</b>   |
|---|---|
| Ms Emilie CANTREL, laboratory technician  | Ms Stephanie MOROT-BIZOT, director  |
|  |  |

Figure 1 – représentations graphiques des résultats des essais :

*Essai 1*



*Essai 2*



| <b>Writer</b>   | <b>Supervisor</b>   |
|---|---|
| Ms Emilie CANTREL, laboratory technician  | Ms Stephanie MOROT-BIZOT, director  |
|  |  |

Tableau A2 — Tableau de résultats du produit F010436V6 soumis à essai contre le virus de la vaccine en conditions de saleté

| PRODUIT                                    | Concentration    | Substance interférente                             | Niveau de cytotoxicité   | Lg TCID <sub>50</sub> |       |        |        |        |        | Réduction           |
|--|------------------|--|--------------------------|-----------------------|-------|--------|--------|--------|--------|---------------------|
|  |                  |  |                          | 0                     | 5 min | 10 min | 15 min | 30 min | 60 min |                     |
| F010436V6<br>ESSAI 1                       | 0,50%            | 3 g/L BSA +<br>3 mL/L<br>érythrocytes<br>de mouton | 1,500                    | 6,125                 | 2,875 | 1,875  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 10 min<br>R = 4,250 |
| F010436V6<br>ESSAI 1                       | 0,40%            | 3 g/L BSA +<br>3 mL/L<br>érythrocytes<br>de mouton | N.T.                     | 6,125                 | 3,125 | N.T.   | 1,875  | N.T.   | N.T.   | 15 min<br>R = 4,250 |
| F010436V6<br>ESSAI 2                       | 0,50%            | 3 g/L BSA +<br>3 mL/L<br>érythrocytes<br>de mouton | 1,500                    | 6,250                 | 2,625 | 1,875  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 10 min<br>R = 4,375 |
| F010436V6<br>ESSAI 2                       | 0,40%            | 3 g/L BSA +<br>3 mL/L<br>érythrocytes<br>de mouton | N.T.                     | 6,250                 | 3,375 | N.T.   | 2,125  | N.T.   | N.T.   | 15 min<br>R = 4,125 |
| Glutardialdéhyde<br>ESSAI 1                | 100 ppm          | PBS  | 1,875                    | 6,125                 | 1,750 | N.T.   | N.T.   | N.T.   | N.T.   |                     |
| Glutardialdéhyde<br>ESSAI 2                | 100 ppm          | PBS  | 2,000                    | 3,375                 | 1,875 | N.T.   | N.T.   | N.T.   | N.T.   |                     |
| Contrôle viral<br>d'infectivité<br>ESSAI 1 | N.A.             | PBS  | N.A.                     | 6,125                 | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 6,125  |                     |
| Contrôle viral<br>d'infectivité<br>ESSAI 1 | N.A.             | 3 g/L BSA +<br>3 mL/L<br>érythrocytes<br>de mouton | N.A.                     | 6,125                 | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 6,125  |                     |
| Contrôle viral<br>d'infectivité<br>ESSAI 2 | N.A.             | PBS  | N.A.                     | 6,375                 | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 6,375  |                     |
| Contrôle viral<br>d'infectivité<br>ESSAI 2 | N.A.             | 3 g/L BSA +<br>3 mL/L<br>érythrocytes<br>de mouton | N.A.                     | 6,375                 | N.T.  | N.T.   | N.T.   | N.T.   | 6,375  |                     |
| Sensibilité des<br>cellules au virus       | 10 <sup>-2</sup> | N.A.   | Cellules<br>non traitées | 6,250                 |       |        |        |        |        |                     |
|  |                  | N.A.   | Cellules<br>traitées     | 5,875                 |       |        |        |        |        |                     |

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

Tableau A3 — Données brutes du produit F010436V6 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   |      |
| F010436V6<br>ESSAI 1               | 0,50%         | 3 g/l BSA<br>+ 3 mL/L<br>érythrocytes<br>de mouton | 10 min           | 4444      | 4440 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                                    |               |  |                  | 4444      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                                    | 5 min         |  | 4444             | 4444      | 4440 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                                    |               |  | 4444             | 4444      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                                    | 15 min        |  | 4444             | 4440      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| 4444                               | 0000          | 0000   | 0000             | 0000      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |
| 0,40%                              | 5 min         | 4444   | 4444             | 4444      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                                    |               | 4444   | 4444             | 4000      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| Témoin<br>eau                      | Témoin<br>eau | 4444   | 4444             | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                                    |               | 4444   | 4444             | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| F010436V6<br>cytotoxicité          | 0,50%         | 3 g/l BSA<br>+ 3 mL/L<br>érythrocytes<br>de mouton | N.A.             | 4444      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| Glutardialdéhyde                   | 100 ppm       | PBS  | 5                | 4444      | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                                    |               |  |                  | 4444      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| Glutardialdéhyde<br>(cytotoxicité) | 100 ppm       | PBS  | N.A.             | 4444      | 4400 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. |      |
| Contrôle viral<br>d'infectivité    | N.A.          | 3 g/L BSA  | 0                | 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 | 4000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                                    |               |  |                  |           |      |      |      |      |      |      |      |      | 4444 |
| Contrôle viral<br>d'infectivité    | N.A.          | 3 g/l BSA<br>+ 3 mL/L<br>érythrocytes<br>de mouton | 0                | 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 |

|   |   |
|---|---|
| <b>Writer</b>   | <b>Supervisor</b>   |
| 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   |      |
| F010436V6<br>ESSAI 2               | 0,50%         | 3 g/l BSA<br>+ 3 mL/L<br>érythrocytes<br>de mouton | 10 min           | 4444      | 4440 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                                    |               |  |                  | 4444      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                                    | 5 min         |  | 4444             | 4444      | 4000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                                    |               |  | 4444             | 4444      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
|                                    | 15 min        |  | 4444             | 4444      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| 4444                               |               | 4000   | 0000             | 0000      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |
| 0,40%                              | 5 min         | 4444   | 4444             | 4444      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                                    |               | 4444   | 4444             | 4440      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| Témoin<br>eau                      |               | 4444   | 4444             | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                                    |               | 4444   | 4444             | 4444      | 4444 | 4444 | 4440 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| F010436V6<br>cytotoxicité          | 0,50%         | 3 g/l BSA<br>+ 3 mL/L<br>érythrocytes<br>de mouton | N.A.             | 4444      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                                    |               |  |                  | 4444      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| Glutardialdéhyde                   | 100 ppm       | PBS  | 5                | 4444      | 4440 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                                    |               |  |                  | 4444      | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| Glutardialdéhyde<br>(cytotoxicité) | 100 ppm       | PBS  | N.A.             | 4444      | 4440 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. |      |
|                                    |               |  |                  | 4444      | 0000 | 0000 | 0000 |      |      |      |      |      |      |
| Contrôle viral<br>d'infectivité    | N.A.          | 3 g/L BSA  | 0                | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                                    |               |  |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| 60                                 |               |  |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                                    |               |  |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| Contrôle viral<br>d'infectivité    | N.A.          | 3 g/l BSA<br>+ 3 mL/L<br>érythrocytes<br>de mouton | 0                | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                                    |               |  |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
| 60                                 |               |  |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |      |
|                                    |               |  |                  | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 |      |

**Sensibilité des cellules au virus :**

| PRODUIT   | Dilution         | Substance interférente                             |                          | Dilutions |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-----------|------------------|--|--------------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|           |                  |  |                          | -2        | -3   | -4   | -5   | -6   | -7   | -8   | -9   |      |
| F010436V6 | 10 <sup>-2</sup> | 3 g/L BSA +<br>3 mL/L<br>érythrocytes<br>de mouton | Cellules non<br>traitées | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |
|           |                  |  |                          | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 |
|           |                  |  | Cellules<br>traitées     | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |
|           |                  |  |                          | 4444      | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |

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