

Laboratoire de Virologie – UPRES EA3610
CHRU de Lille – Université de Lille 2
Institut Hippocrate, Parc Eurasanté
152 rue du Dr Yersin
59120 Loos lez Lille
France
Tel : (33) 03.20.44.66.88/48.93/69.30
Fax : (33) 03.20.44.48.95
Email : didier.hober@chru-lille.fr

N° de rapport : 2010/26461
Date d'édition : 15/03/2011

**RAPPORT D'ESSAI
DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE
DU PRODUIT SURFANIOS PREMIUM**

**Selon la Norme NF EN 14476+A1 (Janvier 2007)
Vis à vis du virus de la Vaccine**

***EVALUATION OF THE
VIRUCIDAL EFFECT OF
SURFANIOS PREMIUM***

***Test method according to the standard NF EN 14476+A1 (January 2007)
Against Vaccinia virus***

Rapport pour / Report submitted to:

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

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

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

La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous la forme de fac-simile photographique
intégral
The reproduction of this trial report is authorized only under the shape of complete photographic reproduction

I- Introduction / Introduction

A la demande de la société ANIOS, le désinfectant **SURFANIOS PREMIUM** a été évalué pour ses propriétés inactivatrices contre la souche « Elstree » du virus de la Vaccine. L'essai a été effectué selon la norme NF EN 14476+A1 : Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai virucide quantitatif de suspension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine – Janvier 2007.

*As requested by the ANIOS Society, the **SURFANIOS PREMIUM** disinfectant was evaluated for its virucidal inactivating properties against Vaccinia virus strain "Elstree". The testing was carried out in accordance with the standard of NF EN 14476+A1: Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine – January 2007.*

II- Identification du produit / Identification of sample

- Nom du produit / *Name of the product* : SURFANIOS PREMIUM
- Fabricant / *Manufacturer* : Laboratoires ANIOS
- N° de lot – N° de formule / *Lot N° - Formula N°* : L300 06
- Date de réception / *Date of receipt* : 20/11/2009
- Application / *Use* : Nettoyage et désinfection des sols et surfaces / *Cleaning and disinfection of floors and surfaces*
- Aspect du produit / *Appearance of product* : Liquide limpide et vert / *Clear and green liquid*
- pH du produit / *pH Value* : Non dilué (20°C) pH=12,50 / *Undiluted (20°C) pH=12.50*
- Conditions de stockage / *Conditions of storage* : Température ambiante, à l'abri de la lumière / *Room temperature in the dark*

III- Conditions expérimentales / Experimental conditions

- Période d'essai / *Period of analysis* : du 05/08/10 au 27/09/10 / *Through 05/08/10 to 27/09/10*
- Température d'essai / *Test temperature* : 20°C +/- 1°C
- Concentrations en produit testées / *Concentration of test product* : 0.5%, 0.25% et / *and 0.05%*
- Temps de contact / *Contact times* : 5, 15, 30 et / *and 60 minutes*
- Diluant du produit / *Diluent of product* : Eau dure / *Hard water*
- Substances interférentes / *Interfering substances* : Solution de sérum albumine bovine sérique (SAB) et hématies de mouton à la concentration finale dans l'essai de 3 g de SAB et 3 ml d'hématies de mouton par litre / *Bovine serum albumin (BSA) and sheep erythrocytes at final concentration of 3 g of BSA and 3 ml of sheep erythrocytes per liter in test*
- Méthode pour stopper l'activité du produit / *Procedure to inactivate the product* : Gel filtration

IV- Matériel et Méthodes / Material and methods

1- Matériel / Material

a) Virus / Virus

La souche « Elstree » du virus de la Vaccine (ATCC VR-1549) a été fournie par la société LGC Promochem (Molsheim, France).

The Vaccinia virus strain "Elstree" (ATCC VR-1549) was obtained from LGC Promochem (Molsheim, France).

b) Lignée cellulaire / Cell line

La lignée cellulaire Vero (ATCC CCL-81) utilisée pour cultiver le virus de la Vaccine provient de l'European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France).

The Vero cell line (ATCC CCL-81) used with the Vaccinia virus was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France).

2- Méthodes d'essai / Methods

a) Titrage viral / Determination of infectivity

Les suspensions virales traitées ou non traitées par le produit à tester sont diluées en série de 10^{-1} à 10^{-8} , dans du Milieu MEM de Eagle modifié Dulbecco (DMEM, Invitrogen, France) avec 2% de sérum de veau foetal (SVF, Invitrogen, France) glacé. 0,1 ml de chaque dilution est ensuite transféré dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établi de cellules Vero, en commençant par la dilution la plus élevée. Après une heure d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est additionné à chaque puits. La lecture de l'effet cytopathogène (ECP) se fait au microscope inversé après 7 et 9 jours d'incubation. Le calcul du titre de l'infectivité virale (\log_{10} DICT₅₀/ml) est déterminé par la méthode Spearman-Kärber.

The viral suspensions treated or non-treated with the product were diluted from 10^{-1} to 10^{-8} in ice-cold Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, France) containing 2% fetal calf serum (FCS, Invitrogen, France). 0.1 ml of each dilution was transferred, beginning with the highest dilution, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established Vero monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytopathic effect (CPE) was read by using an inverted microscope after 7 and 9 days in a 5% CO₂-atmosphere. Calculation of estimated virus concentration (\log_{10} TCID₅₀/ml) was carried out by the Spearman-Kärber method.

b) Détermination de la concentration subcytotoxique du produit / *Determination of cytotoxicity of the product*

Les solutions d'essai du produit additionnées de 1/5^{ème} d'eau pour préparation injectable sont diluées de 10^{-1} à 10^{-8} dans du milieu DMEM 2% SVF glacé. 0,1 ml de chaque dilution est distribué dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établi de cellules Vero. Après une incubation d'une heure à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est ajouté aux puits. L'effet subcytotoxique est apprécié après une incubation de 7 et 9 jours à 37°C en présence de 5% de CO₂.

For determination of cytotoxicity of the disinfectant solutions, eight parts by volume of solutions of disinfectant mixed with two parts by volume of water for injection, were diluted from 10^{-1} to 10^{-8} with ice-cold DMEM containing 2% FCS. 0.1 ml of each dilution was transferred, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established Vero monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytotoxic effect was read after 7 and 9 days at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere.

c) Elimination de la cytotoxicité du produit / *Elimination of cytotoxicity*

Les solutions d'essai du produit additionnées de 1/5^{ème} d'eau pour préparation injectable, sont filtrées sur colonne Microspin S-400 HR (GE Healthcare). Les filtrats sont ensuite dilués de 10^{-1} à 10^{-8} dans du milieu DMEM à 2% de SVF glacé. 0,1 ml de chaque dilution est distribué dans 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établie de cellules Vero. Après une incubation d'une heure à 37°C en présence de 5% de CO₂, 0,1 ml de milieu de culture est ajouté aux puits. L'effet subcytotoxique est apprécié après une incubation de 7 et 9 jours à 37°C en présence de 5% de CO₂.

For elimination of cytotoxicity of the disinfectant solutions, eight parts by volume of solutions of disinfectant mixed with two parts by volume of water for injection, were filtrated on Microspin S-400 HR column (GE Healthcare). Then filtrates were diluted from 10^{-1} to 10^{-8} with ice-cold DMEM + 2% FCS. 0.1 ml of each dilution was transferred, into six wells of a 96 wells microtitre plate with an established Vero monolayer. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere. 1 h after 0.1 ml of culture medium was added to each well. The cytotoxic effect was read after 7 and 9 days at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere.

d) Sensibilité des cellules au virus / *Cell sensitivity to virus*

Un titrage comparatif du virus est réalisé sur les cellules Vero traitées ou non par le désinfectant afin de tester la réduction de sensibilité des cellules au virus en présence du produit. 0,1 ml de la plus basse dilution en milieu DMEM à 2% de SVF apparemment non cytotoxique du désinfectant ou de PBS dilué en milieu DMEM à 2% de SVF est distribué dans 8 x 6 puits d'une plaque 96 puits de microtitration contenant un tapis monocellulaire pré-établie de cellules Vero. Après 1 h à 37°C en présence de 5% de CO₂, le milieu de culture est éliminé des puits et 0,1 ml de virus dilués de 10^{-1} à 10^{-8} dans du milieu de culture à 2% de SVF, est distribué en parallèle sur les cellules traitées ou non traitées. La lecture de l'effet cytopathogène (ECP) se fait après 7 et 9 jours d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂ et le titre viral est calculé.

A comparative virus titration is performed on Vero cells that have or have not been treated with the disinfectant to check the reduction of the cells sensitivity to the virus. 0.1 ml of the lowest apparently non-cytotoxic dilution of the disinfectant in DMEM + 2% FCS or of PBS diluted in DMEM + 2% FCS are distributed onto 8 x 6 wells of a 96 wells microtitre plate with an established Vero monolayer. After 1 h at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere, culture medium is removed from the wells and 0.1 ml of virus diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with culture medium + 2% FCS was added on treated or untreated cells in parallel. The cytopathic effect (CPE) was read after 7 and 9 days at 37°C in a 5% CO₂-atmosphere and the virus titer was calculated.

e) Mesure de l'activité virucide du produit / *Determination of virucidal activity*

Les essais de virucidie du produit consistent à mettre en contact 1 volume de suspension de virus avec 1 volume de substance interférente et 8 volumes de la solution d'essai. Après différents temps de contact à une température de 20°C +/- 1°C, un aliquot de mélange est prélevé et filtré sur colonne Microspin S-400 HR. La quantité de virus résiduel dans le filtrat a été évaluée par la technique de titrage sur cellule Vero.

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

To test the virucidal activity of the product 1 part by volume of virus was incubated at 20°C +/- 1°C with 1 part by volume of interfering substances and 8 parts by volume of the solution of disinfectant. After different incubation time, an aliquot of mixture was taken and filtered on Microspin S-400 HR column. The quantity of residual virus in the filtrate was evaluated by titration on Vero cell.

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

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

Huit Volumes des solutions d'essai du produit sont additionnés à 1 volume de milieu de culture et 1 volume de substance interférente. Immédiatement après la préparation du mélange, au temps 0, 0,1ml du mélange sont filtrées sur colonne Microspin S-400 HR. Les filtrats additionnés de 1/10^{ème} de virus sont ensuite incubés pendant 30 min dans un bain de glace fondante. Puis les suspensions virales sont diluées de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu de culture glacé et la quantité de virus résiduel est évaluée par la technique de titrage sur cellule Vero.

Eight parts by volume of solutions of disinfectant are mixed with 1 part by volume of interfering substances and 1 part by volume of culture medium. Immediately after preparation of the mixture, at time 0, 0.1ml of the mixtures are filtered on Microspin S-400 HR column. Then nine parts by volume of the filtrates are mixed with one part by volume of virus and the mixtures are leaved in an ice bath for 30 min. Then the viral suspensions were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ in ice-cold culture medium and the quantity of residual virus was evaluated by titration on Vero cell.

g) Inactivation du virus au formaldéhyde à 0,7% (m/v) / *Inactivation of virus with 0.7% (w/v) formaldehyde*

La suspension de virus a été soumise à des essais virucides vis-à-vis du formaldéhyde à 0,7% (m/v) comme substance de référence pour l'inactivation virale afin de contrôler l'uniformité du comportement de notre souche virale aux agents chimiques au cours du temps.

Les essais consistent à mettre en contact 1 volume de suspension de virus avec 4 volumes de solution tamponnée au phosphate (PBS, Invitrogen, France) et 5 volumes de formaldéhyde à 1,4% (m/v). Après des temps de contact de 5 min, 15 min, 30 min et 60 min à une température de 20°C +/- 1°C, un aliquote de mélange est prélevé et filtré sur colonne Microspin S-400 HR. La quantité de virus résiduel dans le filtrat a été évaluée par la technique de titrage sur cellule Vero.

The suspension of virus was subjected to virucidal tests against 0.7% (w/v) formaldehyde solution as reference substance for viral inactivation in order to control the uniformity of the behaviour of our virus stock to the chemical agents during the time.

To test the virucidal activity 1 part by volume of virus was incubated with 4 parts by volume of phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen, France) and 5 parts by volume of 1.4% (w/v) formaldehyde. After incubation time of 5 min, 15 min, 30 min and 60 min at 20°C +/- 1°C, an aliquot of mixture was taken and filtered on Microspin S-400 HR column. The quantity of residual virus in the filtrate was evaluated by titration on Vero cell.

V- Résultats / Results

1) Détermination de la dilution subcytotoxique du produit **SURFANIOS PREMIUM** et du filtrat sur colonne Microspin / Determination of subcytotoxic dilution of product **SURFANIOS PREMIUM** and filtrate on Microspin column :

| Méthode / Method | Dilution subcytotoxique / subcytotoxic dilution | | | |
|---|---|---------------------------|---------------------------|---|
| | SURFANIOS PREMIUM (0.5%) | SURFANIOS PREMIUM (0.25%) | SURFANIOS PREMIUM (0.05%) | Formaldéhyde (0,7%) / Formaldehyde (0.7%) |
| Technique par dilution / Dilution method | 1/1 000 | 1/100 | 1/100 | 1/10 000 |
| Filtration sur Microspin / Microspin filtration | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/50 |

2) Evaluation de la sensibilité des cellules au virus suite au traitement par le produit **SURFANIOS PREMIUM** ou le Formaldéhyde à 0,7% / Evaluation of Cell sensitivity to virus after treatment with **SURFANIOS PREMIUM** or 0.7% Formaldehyde

| | Log ₁₀ DICT ₅₀ / Log ₁₀ TCID ₅₀ | |
|---|---|---|
| | SURFANIOS PREMIUM (0.5%) | Formaldéhyde (0,7%) / Formaldehyde (0.7%) |
| Cellules non traitées / Non treated cells | 6.50 | 6.50 |
| Cellules traitées / Treated cells | 6.33 | 6.33 |

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

| Produit / Product | Concentration | Log ₁₀ DICT ₅₀ (FR)/ Log ₁₀ TCID ₅₀ (RF) |
|---------------------------------|---------------|---|
| Témoin virus / Virus control | n.a. | 5.50 |
| SURFANIOS PREMIUM | 0.5% | 5.50 (0.00) |
| SURFANIOS PREMIUM | 0.25% | 5.50 (0.00) |
| SURFANIOS PREMIUM | 0.05% | 5.50 (0.00) |

Légende / legend :

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

4) Evaluation de l'effet virucide du produit **SURFANIOS PREMIUM** / Evaluation of virucidal activity of **SURFANIOS PREMIUM** :

Tableau des résultats de virucidie du produit SURFANIOS PREMIUM en conditions de saleté sur la souche « Elstree » du virus de la Vaccine

Table on virucidal activity of SURFANIOS PREMIUM in clean conditions on Vaccinia virus strain "Elstree"

| Produit / Product | Concentration | Substance interférente / Interfering solution | Log ₁₀ DICT ₅₀ après xx min (FR)/ Log ₁₀ TCID ₅₀ after xx min (RF) | | | | | >4 log réduction après xx min / >4 log reduction after xx min |
|------------------------------|---------------|---|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---|
| | | | <0.5 | 5 | 15 | 30 | 60 | |
| Témoin virus / Virus control | n.a. | 3 g/l SAB et 3 ml/l hématies de mouton / 3 g/l BSA and 3 ml/l sheep erythrocyte | 5.16 | n.t. | n.t. | n.t. | 4.83 | n.a. |
| SURFANIOS PREMIUM | 0.5% | | 3.83 (1.33) | 1.83 (3.33) | 0.50 (4.66) | 0.50 (4.66) | 0.50 (4.66) | ≥15 min |
| SURFANIOS PREMIUM | 0.25% | | 4.00 (1.16) | 3.00 (2.16) | 2.83 (2.33) | 1.83 (3.33) | 0.50 (4.66) | ≥60 min |
| SURFANIOS PREMIUM | 0.05% | | 5.00 (0.16) | n.t. | n.t. | n.t. | 4.66 (0.83) | >60 min |

Tableau des résultats de virucidie du Formaldéhyde 0,7% sur la souche « Elstree » du virus de la Vaccine

Table on virucidal activity of 0.7% Formaldehyde on Vaccinia virus strain "Elstree"

| Produit / Product | Concentration | Substance interférente / Interfering solution | Log ₁₀ DICT ₅₀ après xx min (FR)/ Log ₁₀ TCID ₅₀ after xx min (RF) | | | | | >4 log réduction après xx min / >4 log reduction after xx min |
|------------------------------|---------------|---|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---|
| | | | <0.5 | 5 | 15 | 30 | 60 | |
| Témoin virus / Virus control | n.a. | PBS | 5.16 | n.t. | n.t. | n.t. | 4.83 | n.a. |
| Formaldéhyde / Formaldehyde | 0.7% | | 4.50 (0.66) | 3.66 (1.50) | 3.16 (2.00) | 1.50 (3.66) | 0.50 (4.66) | ≥60 min |

Légende / legend :

n.a. : non applicable / non applicable

n.t. : non soumis à l'essai / non tested

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

VI- Conclusion / Conclusion

Le produit **SURFANIOS PREMIUM** est actif à la concentration de 0.25% après un temps de contact de 60 minutes, et à la concentration de 0,5% après un temps de contact de 15 minutes, selon la norme NF EN 14476+A1, dans des conditions de saleté vis-à-vis de la souche « Elstree » du virus de la Vaccine.

*Product **SURFANIOS PREMIUM** is active at the concentration of 0.25% after 60 minutes of exposure time, and at the concentration of 0,5% after 15 minutes exposure time, according to the standard NF EN 14476+A1, in dirty conditions against the Vaccinia virus strain "Elstree".*

Lille, le 15 mars 2011

Responsable technique

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'P. E. LOBERT', written over a horizontal line.

Dr. P. E. LOBERT

Chef de Service

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'D. HOBER', written over a horizontal line.

Pr. D. HOBER

Annexe 1 / Annex 1 :

Représentation graphique des résultats de virucidie de **SURFANIOS PREMIUM** en conditions de saleté vis-à-vis du virus de la vaccine

*Figure of virucidal activity of **SURFANIOS PREMIUM** in dirty conditions against Vaccinia virus*

