

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

EN : 13727 (Phase 2, étape 1)

Nom du produit : DDN-Surf

N° Lot : 4996

Fabricant : Franklab

Aspect du produit : Liquide, Couleur Bleu-Vert

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

Méthode par dilution-neutralisation:

Raisons du choix de la méthode : Méthode recommandée par la norme EN 13727

Neutralisant utilisé : Bouillon Lethen Référence VWR : 301580ZA

Température d'essai : 20°C

Substances interférentes: Conditions de Saleté (BSA 3 g/L + GRm 3 ml/L)

Souche d'essai : *Enterococcus hirae* CIP 58.55

Température d'incubation : 37°C

Date de l'essai : 23/9/15

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

Aspect des dilutions du produit: Liquide, Incolore

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

Validation et témoins

Suspension de validation (N _{vo})			Témoin des conditions expérimentales (A)			Témoin de toxicité du neutralisant (B)			Validation de la méthode (C)		
V _{c1}	63	$\bar{x} = 74$	V _{c1}	88	$\bar{x} = 79$	V _{c1}	56	$\bar{x} = 58$	V _{c1}	89	$\bar{x} = 72$
V _{c2}	88		V _{c2}	70		V _{c2}	59		V _{c2}	54	
30 ≤ \bar{x} de N _{vo} ≤ 160 ?			\bar{x} de A est ≥ 0,5 × \bar{x} de N _{vo} ?			\bar{x} de B ≥ 0,0005 × N _{vb}			\bar{x} de C est ≥ 0,5 × \bar{x} de N _{vo} ?		
Oui	<input checked="" type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	Oui	<input checked="" type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	Oui	<input checked="" type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	Oui	<input checked="" type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Suspension de validation (N _{vb}), 10 ⁻³			V _{c1}	97	$\bar{x} = 91$	30 ≤ \bar{x} de N _{vb} / 1000 ≤ 160 ?					
			V _{c2}	85		Oui	<input checked="" type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>		

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

Comme indiqué dans la norme, la concentration du produit utilisée pour valider la norme est la concentration la plus élevée étudiée soit ici 0,5%.

Suspension d'essai et Essai

Suspension d'essai (N et N ₀)	N	V _{c1}	V _{c2}	N = (314 + 337 + 55 + 57) / 2,2.10 ⁻⁶ = 8,54 log N ₀ = N/10 = 7,54 log N ₀ est compris entre 7,17 et 7,70 ?	Oui	Non
	10 ⁻⁶	314	337		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	10 ⁻⁷	55	57			

Concentration /temps de contact	Facteur de dilution	V _{c1}	V _{c2}	N _a = $\bar{x} \times 10$	Log N _a	Log R (N ₀ = 7,54)
0,5% 5 minutes	10 ⁰	0*	0*	<140	<2,15	>5,38
	10 ⁻¹	0	0			
0,5% 10 minutes	10 ⁰	0*	0*	<140	<2,15	>5,38
	10 ⁻¹	0	0			
0,25% 5 minutes	10 ⁰	0*	0*	<140	<2,15	>5,38
	10 ⁻¹	0	0			
0,25% 10 minutes	10 ⁰	0*	0*	<140	<2,15	>5,38
	10 ⁻¹	0	0			
0,25% 15 minutes	10 ⁰	0*	0*	<140	<2,15	>5,38
	10 ⁻¹	0	0			
0,125% 5 minutes	10 ⁰	0*	0*	<140	<2,15	>5,38
	10 ⁻¹	0	0			
0,125% 10 minutes	10 ⁰	0*	0*	<140	<2,15	>5,38
	10 ⁻¹	0	0			
0,0625% 5 minutes	10 ⁰	Inc	Inc	>66000	>4,82	<2,71
	10 ⁻¹	Inc*	Inc*			

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

Contrôle des moyennes pondérées : D = [(314 + 337)/2] / [(55 + 57)/2] = 5,8

5,8 est compris entre 5 et 15.

Remarques à propos des résultats

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

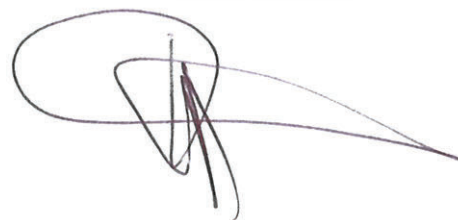
Conclusion

Des tests ont été effectués sur les souches référencées *Staphylococcus aureus* CIP 4.83, *Enterococcus hirae* CIP 58.55, *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103.467. Les essais ont été effectués une fois. La réduction avec la souche d'essai limitante *Pseudomonas aeruginosa* en 5 minutes à 0,25% est de $2,82 \cdot 10^5$ soit 5,45 log.

Conformément à la norme **EN 13727**, le lot **4996** du produit **DDN Surf**, lorsqu'il est concentré à **0,25%** (V/V) dans de l'**eau dure** (Produit utilisé dilué), présente une activité **bactéricide** en **5 minutes** à **20°C**, dans les **conditions de saleté** (3 g/l d'albumine bovine et 3 ml/l de globules rouges de mouton), vis-à-vis de la souche référencée *P. aeruginosa*, pour une activité de désinfections des surfaces.

Clermont-Ferrand, le 8/10/2015.

Pr. O. TRAORÉ



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

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

Client

FRANKLAB
BP 63
78185 Saint Quentin en Yvelines

Identification de l'échantillon

Nom du produit : DDN-Surf
Fabricant : Franklab
Diluant du produit dont l'utilisation est recommandée par le fabricant : Aucun (Produit utilisé pur)
Substance(s) active(s) : Non spécifié
Date de livraison du produit : 11/9/15
Date de péremption : Non renseigné
Période d'analyse : Du 21/9/15 au 24/9/15

Résultats d'essai

EN : 13624 (Phase 2, étape 1)

Nom du produit : DDN-Surf
N° Lot : 4996
Fabricant : Franklab
Aspect du produit : Liquide, Couleur Bleu-Vert
Conditions de stockage (température, etc.) : Obscurité, température ambiante

Méthode par dilution-neutralisation:

Raisons du choix de la méthode : Méthode recommandée par la norme EN 13624
Neutralisant utilisé : Bouillon Lethen Réf VWR : 301580ZA
Gélose utilisée : GEM Sans Peptone
Température d'essai : 20°C
Substances interférentes : **Conditions de Saleté** (BSA 3 g/L + GRm 3 ml/L)
Souche d'essai : *Candida albicans* IP 48.72
Température d'incubation : 30°C
Date de l'essai : 21/9/15
Diluant utilisé pour les solutions d'essai du produit : Eau dure
Aspect des dilutions du produit: Liquide, Incolore
Aspect du produit lors de l'essai: Absence de précipité

Fina EN 13624 - C. albicans - 11.2015

Validation et témoins

Suspension de validation (N_{vo})			Témoin des conditions expérimentales (A)			Témoin de toxicité du neutralisant (B)			Validation de la méthode (C)		
V_{c1}	53	$\bar{x} = 53$	V_{c1}	46	$\bar{x} = 43$	V_{c1}	39	$\bar{x} = 40$	V_{c1}	57	$\bar{x} = 55$
V_{c2}	53		V_{c2}	39		V_{c2}	40		V_{c2}	53	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{vo} \leq 160 ?$			$\bar{x} \text{ de } A \text{ est } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{vo} ?$			$\bar{x} \text{ de } B \geq 0,0005 \times N_{vB}$			$\bar{x} \text{ de } C \text{ est } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{vo} ?$		
Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>			Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>			Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>			Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>		
Suspension de validation (N_{vB}), 10^{-3}			V_{c1}	57	$\bar{x} = 55$	$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{vB} / 1000 \leq 160 ?$					
			V_{c2}	53		Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>					

V_c : Nombre d'UFC comptées/ml ; N : Nombre d'UFC dans la suspension d'essai ; N_0 : Nombre d'UFC dans le mélange d'essai ; N_a : Nombre d'UFC dénombrées après contact avec le produit ; N_{vo} : Nombre d'UFC/ml dans la dilution de la suspension de validation ; R : Réduction du nombre de bactéries. Inc : Incomptable

Comme indiqué dans la norme, la concentration du produit utilisée pour valider la norme est la concentration la plus élevée étudiée soit ici 0,5%.

Suspension d'essai et Essai

Suspension d'essai (N et N_0)	N	V_{c1}	V_{c2}	$N = (226 + 217 + 35 + 35) / 2,2 \times 10^{-5} = 7,37 \text{ log}$ $N_0 = N/10 = 6,37 \text{ log}$ $N_0 \text{ est compris entre } 6,17 \text{ et } 6,70$	Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
	10^{-5}	226	217		
	10^{-6}	35	35		

Concentration / temps de contact	Facteur de dilution	V_{c1}	V_{c2}	$N_a = \bar{x} \times 10$	Log N_a	$\log R$ ($N_0 = 6,37$)
0,5% 5 minutes	10^0	0	0	<140	<2,15	>4,22
	10^{-1}	0	0			
0,5% 10 minutes	10^0	0	0	<140	<2,15	>4,22
	10^{-1}	0	0			
0,25% 5 minutes	10^0	0	0	<140	<2,15	>4,22
	10^{-1}	0	0			
0,25% 10 minutes	10^0	0	1	<140	<2,15	>4,22
	10^{-1}	1	0			
0,25% 15 minutes	10^0	0	0	<140	<2,15	>4,22
	10^{-1}	0	0			
0,125% 5 minutes	10^0	>660	>660	>66000	>4,82	<1,55
	10^{-1}	>660	>660			
0,125% 15 minutes	10^0	477	492	4863	3,69	2,68
	10^{-1}	53	48			

V_c : Nombre d'UFC comptées/ml ; N : Nombre d'UFC dans la suspension d'essai ; N_0 : Nombre d'UFC dans le mélange d'essai ; N_a : Nombre d'UFC dénombrées après contact avec le produit ; N_{vo} : Nombre d'UFC/ml dans la dilution de la suspension de validation ; R : Réduction du nombre de bactéries. Inc : Incomptable

Contrôle des moyennes pondérées : $D = [(226 + 217) / 2] / [(35 + 35) / 2] = 6,32$
6,32 est compris entre 5 et 15.

Remarques à propos des résultats

- ✓ Tous les témoins et le mélange de validation de la méthode donnent des valeurs comprises à l'intérieur des limites de base.
- ✓ Une concentration du produit au moins a présenté une réduction logarithmique d'au moins 4 log.
- ✓ Absence de précipité lors de l'essai.

Conclusion

Des tests ont été effectués sur la souche référencée *Candida albicans* IP 48.72. Les essais ont été effectués une fois. La réduction avec la souche d'essai *C. albicans* en 5 minutes à 0,25% est de $1,66 \cdot 10^4$ soit 4,22 log.

Conformément à la norme EN 13624 (2013), le lot 4996 du produit DDN-Surf, lorsqu'il est concentré à 0,25% (V/V) dans de l'eau dure (Produit utilisé dilué), présente une activité levuricide en 5 minutes à 20°C, dans les conditions de saleté (BSA 3g/L + GRm 3 ml/L), vis-à-vis de la souche référencée *Candida albicans* pour une activité de désinfection de surfaces.

Clermont-Ferrand, le 06/10/2015.

Pr. O. TRAORÉ



RAPPORT D'ESSAI

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

Délivré à : **MME CHAKCHOUK**

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



Demande d'essai du: 12/04/2017

Références du dossier d'analyses: n°061D04-2017-10

ESSAIS DE VIRUCIDIE:

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

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

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

Date d'émission : 04/07/2017

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

Professeur Georges HERBEIN
Professeur des Universités Médecin Hospitalier
Expert scientifique



SOMMAIRE

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

1 LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES ESSAIS

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 BESANÇON
FRANCE

2 IDENTIFICATION COMPLETE DES ECHANTILLONS

DDN SURF

Numéro de lot: n° 5193
Date d'expiration: non précisé
Fabricant: FRANKLAB
Date de fabrication: non précisé
Conditions de stockage: selon les indications fournies par le fabricant
Composants actifs: ammoniums quaternaires
Aspect: liquide turquoise
Diluant préconisé par le fabricant: eau potable
Date de réception au laboratoire: 18/04/2017
Période de l'étude: 19/04/2017 au 30/06/2017

3 CONDITIONS EXPERIMENTALES

Température d'essai: 20°C ± 1°C
Méthode de titrage: virus titré virus titré en log URL/mg (unité relative de lumière), par marquage du virus à la luciférase. **Le protocole a été adapté pour permettre la mesure du titre viral par mesure de l'activité luciférase, du fait de l'effet cytopathique très discret et difficile à lire du VIH.**
Temps de contact: 5 minutes, 15 minutes et 60 min
Concentration cible: 0,25%
Diluant du produit utilisé lors des essais: eau dure
Souche de virus testée: VIH-1 souche pNL4-3Luc, cultivé sur cellules lymphoïdes 1G5, à 37°C, sous 5% CO2
Substance interférente: 3 g/l de sérum albumine bovine + 3 ml érythrocytes de mouton
Stabilité du produit en présence de substance interférente: bonne
Technique d'arrêt de l'action virucide: à froid

Titre viral :

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

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

4 VALIDATION DE LA METHODE

a) Méthodologie

Le produit DDN SURF a été testé sur des cultures de cellules IG5 et une faible cytotoxicité a été observée (jusqu'à la dilution 10^{-1}).

b) Sensibilité des cellules aux virus

Pour chacune des suspensions virales utilisées lors de la réalisation de ces essais, des titrages comparatifs du virus sont réalisés sur les cellules traitées ou non par le produit.

Dilution produit	Titre de virus (log URL/mg)		
	Suspension virale sur cellules non traitées	Suspension virale sur cellules traitées	Différence de titre viral (log URL/mg)
DDN SURF 10^{-1}	6,500	6,250	0,250

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

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

Concentration du produit	Substances interférentes	Titre de virus (log URL/mg)	Différence avec la suspension virale d'essai
DDN SURF 0,25%	3 g/l de sérum albumine bovine + 3 ml érythrocytes de mouton	Essai 1: 6,500	0,000
		Essai 2: 6,500	0,000

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

d) Essai d'inactivation de référence

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

La validation des essais est effective si la réduction du titre viral entre la suspension témoin et la suspension soumise au formaldéhyde est comprise entre -0,5 et -2,5 log après 30 min. La réduction est de 1,375 log après 30 min et les conditions de la norme sont donc remplies.

5 ESSAIS PROPREMENT DITS – CALCUL DE L'ACTIVITE VIRUCIDE

Essai 1

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

PRODUIT	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log URL/mg)	Réduction du titre viral
DDN SURF	0,25%	5 min	20°C	4,500	2,000
		15 min		2,500	4,000
		60 min		1,500	5,000

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

Essai 2

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

PRODUIT	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log URL/mg)	Réduction du titre viral
DDN SURF	0,25%	5 min	20°C	4,500	2,000
		15 min		2,500	4,000
		60 min		1,500	5,000

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

6 VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE

Les essais réalisés satisfont aux critères de validation car:

- Le titre de la suspension virale d'essai est suffisamment important pour permettre une observation de réduction de 4 log après essais; il est de 6,500 log URL/mg pour le virus HIV.
- La différence des titres entre témoin viral et virus de référence dans l'essai d'inactivation est comprise entre -0.5 et -2.5 après 30 min; la différence est de 1,375 log après 30 min d'inactivation par le formaldéhyde pour le virus HIV.
- Le produit testé n'affecte pas significativement la morphologie des cellules.
- Les conditions d'essai en saleté (3 g/l de sérum albumine bovine + 3 ml érythrocytes de mouton) n'affectent pas l'infectivité du virus
- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité des cellules au virus HIV. Les titres de virus mis en contact avec les cellules traitées avec le produit et les cellules non traitées ont une différence inférieure à 1,0 log (la différence est de 0,250 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 DDN SURF est inférieure à 0,5 log (0,0 log URL/mg essai 1 et 0,0 log URL/mg essai 2)

7 CONCLUSION

Les essais réalisés sur le produit DDN SURF lot n° 5193 ont démontré:

- que le produit **DDN SURF** employé à 0.25 %, a une activité virucide sur le virus HIV, selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A1, pour 15 minutes de contact à 20°C, en conditions de saleté.



ANNEXE 1

Lignée cellulaire utilisée : cellules 1G5, ATCC, USA

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

Tampons et milieux de culture:

- Tampon PBS: chlorure de sodium, Panreac, réf. 141659.1211, lot n° 0000204679; sodium phosphate dibasic, Sigma Aldrich, réf. S5136, lot n° BCBC7067V; sodium phosphate monobasic, Sigma Aldrich, réf. S5011, lot n° 1019K01021V
- Milieu MEM, Sigma Aldrich, réf. 0268, lot n° 040M8301
- Milieu DMEM, Sigma Aldrich, réf. D5796, lot n° RNBB9336
- Sérum de veau foetal, Sigma Aldrich, F7524, lot n° 098K3397

Réactifs:

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

Solution d'inactivation:

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

EAU DURE

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

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

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

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

ANNEXE 2

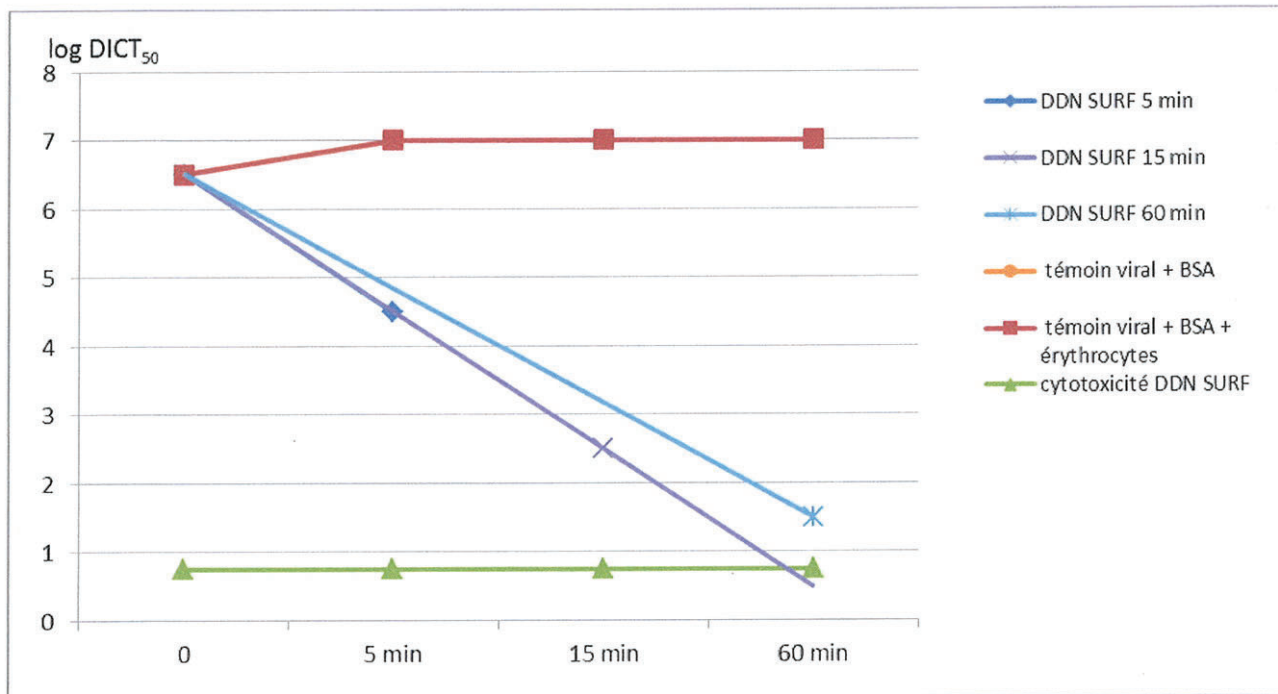
Tableau A1 - Titrage du virus HIV par effet cytopathique, par la méthode de calcul Spaerman-Kärber :

log URL/mg = 6,500

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

Figure 1 – représentations graphiques des résultats des essais :

Essai 1



Essai 2

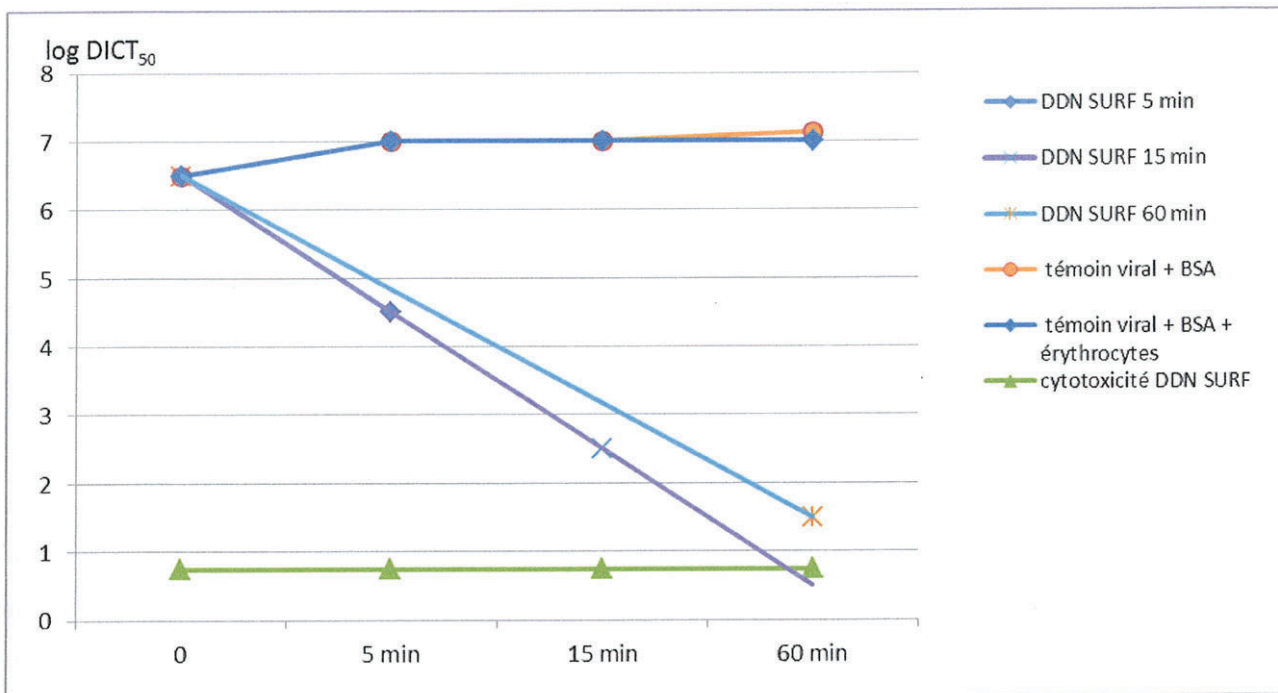


Tableau A2 — Tableau des résultats du produit DDN SURF et du virus HIV dans des conditions de saleté (3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes)

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

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

Essai 1

	Concentration	substance interférente	temps de contact	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8		
DDN SURF essai 1	0,25%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	15 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
			contrôle viral	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000		
		3 g/l BSA	15 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
			contrôle viral	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000		
		DDN SURF essai 1 cytotoxicité	0,25%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A.	4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
						0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
contrôle viral d'infectivité	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000		
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000		
	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000		
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000		
	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	0	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000		
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000		
Formaldéhyde	0,70%		5	4444	4444	4444	4444	1111	1111	0000	0000		
			15	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000		
			30	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000		
Formaldéhyde (cytotoxicité)	0,70%		N.A.	4444	1111	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.		
				4444	1100	0000	0000						

Essai 2

	Concentration	substance interférente	temps de contact	Dilutions								
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	
DDN SURF essai 2	0,25%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	15 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
			contrôle viral	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
		3 g/l BSA	15 min	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
				4444	4000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
			contrôle viral	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
DDN SURF essai 2 cytotoxicité	0,25%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	N.A.	4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
				0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
contrôle viral d'infectivité	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
	N.A.	3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
	N.A.	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	0	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	
Formaldéhyde	0,70%	PBS	5	4444	4444	4444	4444	1111	1111	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	
Formaldéhyde (cytotoxicité)	0,70%	PBS	N.A.	4444	1111	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	
				4444	0000	0000	0000					

Validations avec autres concentrations testées :

	Concentration	substance interférente	temps de contact	dilutions							
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
DDN SURF	0,25%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	5 min	4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	1111	0000	0000	0000	0000
			60 min	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000

	Concentration	substance interférente	temps de contact	Log U		Réduction	
				0	5 min		
DDN SURF	0,25%	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	5 min	6,5	4,5	2	inactive
			60 min	6,5	1,5	5	active

Sensibilité des cellules au virus :

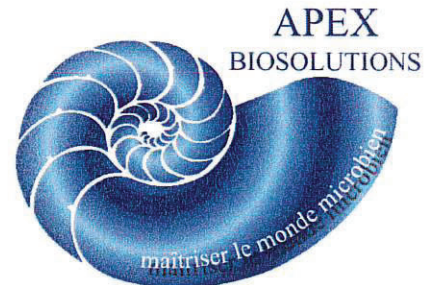
Produit	dilution	substance interférente		Dilutions						
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
DDN SURF	10 ⁻¹	3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes	Cellules non traitées	4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	1111	0000	0000
			Cellules traitées	4444	4444	4444	4 444	1111	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	1100	0000	0000

RAPPORT D'ESSAI

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

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du : 06/09/2021

Références du dossier d'analyses : n°235D42-2021-04

TESTS VIRUCIDES :

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

Essais sur 1 souche de référence : rotavirus humain.

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



Date d'émission : 29/11/2021

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



SOMMAIRE

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

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

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS

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

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

Echantillon	N° lot
F010760V2	7377

Date limite d'utilisation optimale : non communiquée

Fabricant : FRANKLAB

Date de fabrication : non communiquée

Conditions de stockage : Température ambiante et obscurité.

Composants actifs : ammonium quaternaire

Aspect : liquide transparent

Précautions d'emploi : aucune

Diluant préconisé par le fabricant : eau potable

Date de réception au laboratoire : 17/08/2021

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

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

Température d'essai: 20°C ± 1°C

Méthode de titrage: log TCID₅₀

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

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

Diluant du produit utilisé lors des essais: eau dure

Souche virale : rotavirus humain ATCC réf. VR-2551, cultivé sur cellules MA-104, sous atmosphère à 5% CO₂



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

Stabilité du produit en présence de substance interférente : bonne

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

Titre viral :

Titrage du rotavirus par effet cytopathique des virus (calculé selon la méthode de Spearman-Kärber) = 6,875
 log TCID₅₀

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

4. VALIDATION DE LA METHODE

a) Cytotoxicité

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

- Pour le rotavirus, jusqu'à la dilution 10^{-1} .

b) Sensibilité des cellules aux virus

Pour chacune des suspensions virales utilisées lors de la réalisation de ces essais, des titrages comparatifs du virus sont réalisés sur les cellules traitées ou non par le produit.

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

Dilution du produit	Titre de virus (log DICT ₅₀)		
	Suspension virale sur cellules non traitées	Suspension virale sur cellules traitées	Différence de titre viral (log DICT ₅₀)
F010760V2 10^{-2}	6,875	6,125	0,750



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

Concentration du produit	Substances interférentes	Titre de virus (log DICT ₅₀)	Différence avec la suspension virale d'essai
F010760V2	3 g/L BSA + 3 mL/L EM	ESSAI 1: 6,875	0,00
		ESSAI 2: 6,875	0,00

d) Essai d'inactivation de référence

La validation des essais est effective si la réduction du titre viral entre la suspension témoin et la suspension soumise au formaldéhyde est comprise entre -0,5 et -2,5 log après 30 min.

Formaldéhyde 0,7%	Titre de virus (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral (log DICT ₅₀)
Suspension virale témoin	6,875	
inactivation 5 min	6,500	0,375
inactivation 15 min	5,500	1,375
inactivation 30 min	5,000	1,875

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

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

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

ESSAI 1 - La suspension virale témoin a une concentration de 6,875 log TCID₅₀.

PRODUIT	Concentration	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral
F010760V2	0,50%	5 min	20°C	2,125	4,750
		15 min		2,375	4,500
	0,25%	10 min		2,625	4,250
		5 min		3,375	3,500



ESSAI 2 - La suspension virale témoin a une concentration de 6,875 log TCID₅₀.

PRODUIT	Concentration	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral
F010760V2	0,50%	5 min	20°C	2,125	4,625
		15 min		2,375	4,375
	0,25%	10 min		2,500	4,250
		5 min		3,500	3,250

6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE

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

- Le titre de la suspension virale d'essai est suffisamment important pour permettre une observation de réduction de 4 log après essais :
 - o il est de 6,875 log TCID₅₀ pour le rotavirus
- La différence des titres entre témoin viral et virus de référence dans l'essai d'inactivation est comprise entre - 0.5 et -2.5 après 30 min (-4,5 après 60 min pour le poliovirus) : la différence est de 1,875 log après 30 min d'inactivation par le formaldéhyde pour le rotavirus
- Le produit testé n'affecte pas significativement la morphologie des cellules.
- Les conditions d'essai en saleté (3 g/L BSA + 3 mL/L EM) n'affectent pas l'infectivité du virus testé.
- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité des cellules au virus. Pour le rotavirus, la différence est de 0,750 log.

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

7. CONCLUSION

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

- Que le produit F010760V2, employé dès 0,25% a une activité virucide sur le rotavirus humain, selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A2 :2019, pour 10 min de contact et dès 0,50% pour 5 min de contact à 20°C, en conditions de saleté.

8. ANNEXE 1

Rotavirus:

Lignée cellulaire: cellules MA-104 (HPA réf. 85102918, lot n° 11H030)

Souche virale: Rotavirus humain, ATCC réf. VR-2551

Tampons et milieux de culture:



- Tampon PBS: chlorure de sodium, Panreac, réf. 141659.1211, lot n° 0000204679; sodium phosphate dibasic, Sigma Aldrich, réf. S5136, lot n° BCBC7067V; sodium phosphate monobasic, Sigma Aldrich, réf. S5011, lot n° 1019K01021V
- MEM media, Sigma Aldrich, réf. 0268, lot n° 040M8301
- DMEM media, Sigma Aldrich, réf. D5796, lot n° RNBB9336
- Sérum de veau fœtal, Sigma Aldrich, F7524, lot n° 098K3397

Réactifs:

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

Solution d'inactivation :

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

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

9. ANNEXE 2

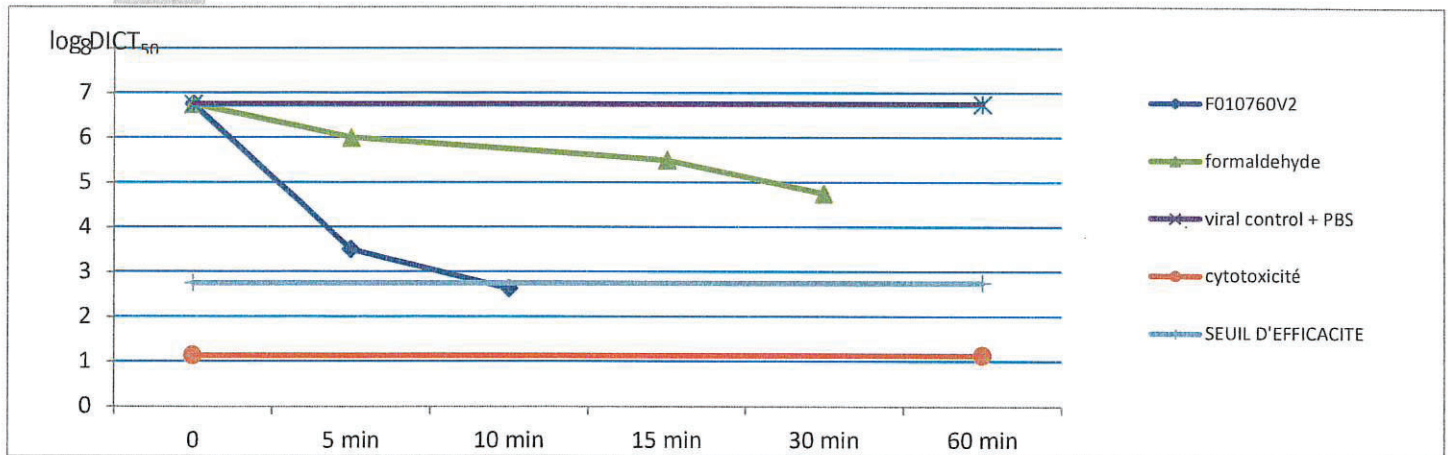
Table A1 – Titrage du rotavirus par effet cytopathique, par la méthode de calcul Spaerman-Kärber :

Log DICT₅₀ = 6,875

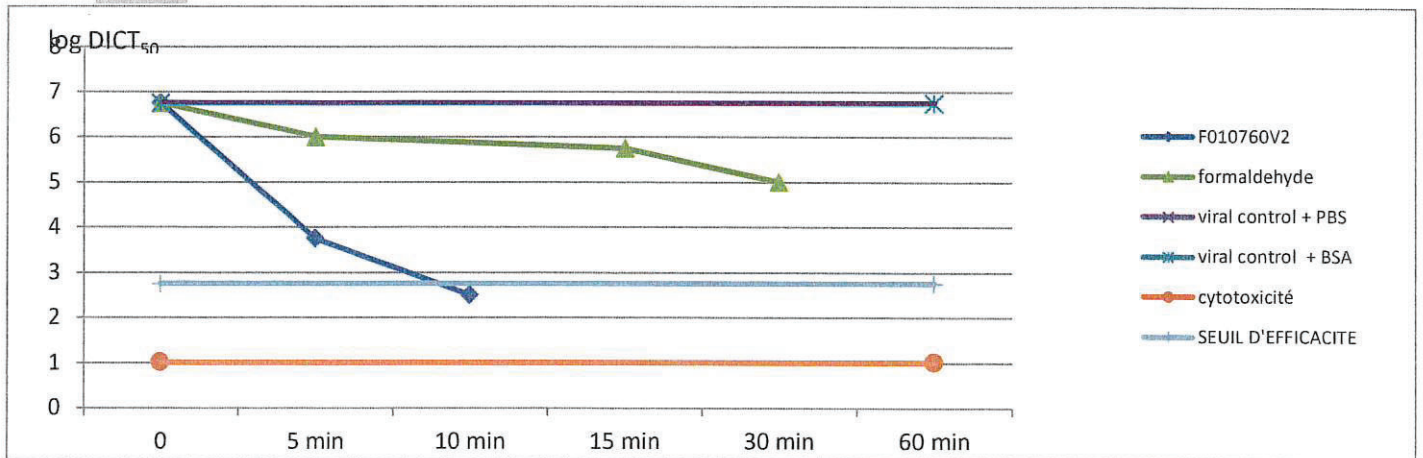
Dilution (- log)	Résultat	% résultats positifs
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	44444444	100
-6	44444444	100
-7	44400000	37,5
-8	00000000	0
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Somme des % de cultures positives		437,5



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
	

F2v1-EN14476-12-21

Tableau A2— Résultats sur rotavirus en conditions de saleté

PRODUIT	Concentration	Substance interférente	Niveau de cytotoxicité	Lg TCID ₅₀						Reduction
				0	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	
F010760V2 ESSAI 1	0,25%	3 g/L BSA + 3 mL/L SE	1,250	6,875	3,375	2,625	2,375	N.T.	N.T.	10 min R = 4,250
F010760V2 ESSAI 2	0,25%	3 g/L BSA + 3 mL/L SE	1,000	6,750	3,500	2,500	2,375	N.T.	N.T.	10 min R = 4,250
Formaldéhyde ESSAI 1	0,70%	PBS	1,875	6,875	6,500	N.T.	5,500	5,000	N.T.	
Formaldéhyde ESSAI 2	0,70%	PBS	1,875	6,750	6,250	N.T.	5,375	5,000	N.T.	
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 1	N.A.	PBS	N.A.	6,875	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,875	
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 1	N.A.	3 g/L BSA + 3 mL/L SE	N.A.	6,875	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,875	
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 2	N.A.	PBS	N.A.	6,875	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,875	
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 2	N.A.	3 g/L BSA + 3 mL/L SE	N.A.	6,875	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,875	
Sensibilité des cellules au virus	10 ⁻²	N.A.	Cellules non traitées	6,875						
		N.A.	Cellules traitées	6,125						

Tableau A3 – Sensibilité des cellules au rotavirus:

PRODUIT	Dilution	Substance interférente		Dilutions								
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	
F010760V2	10 ⁻²	3 g/L BSA + 3 mL/L EM	Cellules non traitées	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4440	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	





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

Tableau A4 — Résultats bruts

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

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

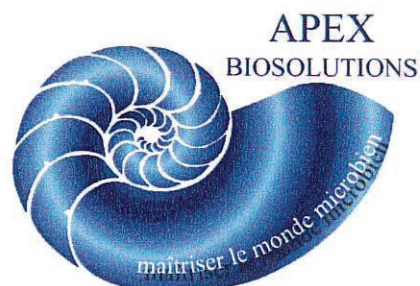
Rédacteur	Superviseur
Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire	Mme Stephanie MOROT-BIZOT, directrice
	

RAPPORT D'ESSAI

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

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du : 06/09/2021

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

TESTS VIRUCIDES :

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

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

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



Date d'émission : 29/11/2021

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



SOMMAIRE

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

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

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS

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

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

Echantillon	N° lot
F010760V2	7377

Date limite d'utilisation optimale : non communiquée

Fabricant : FRANKLAB

Date de fabrication : non communiquée

Conditions de stockage : Température ambiante et obscurité.

Composants actifs : ammonium quaternaire

Aspect : liquide transparent

Précautions d'emploi : aucune

Diluant préconisé par le fabricant : eau potable

Date de réception au laboratoire : 17/08/2021

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

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

Température d'essai: 20°C ± 1°C

Méthode de titrage: log TCID₅₀

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

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

Diluant du produit utilisé lors des essais: eau dure

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



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

Stabilité du produit en présence de substance interférente : bonne

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

Titre viral :

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

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

4. VALIDATION DE LA METHODE

a) Cytotoxicité

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

- Pour le Vaccinia virus, jusqu'à la dilution 10^{-1} .

b) Sensibilité des cellules aux virus

Pour chacune des suspensions virales utilisées lors de la réalisation de ces essais, des titrages comparatifs du virus sont réalisés sur les cellules traitées ou non par le produit.

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

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



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

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

d) Essai d'inactivation de référence

La validation des essais est effective si la réduction du titre viral entre la suspension témoin et la suspension soumise au formaldéhyde est comprise entre -0,5 et -2,5 log après 30 min.

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

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

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

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

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

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



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

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

6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE

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

- Le titre de la suspension virale d'essai est suffisamment important pour permettre une observation de réduction de 4 log après essais :
 - o il est de 6,750 log TCID₅₀ pour le Vaccinia virus
- La différence des titres entre témoin viral et virus de référence dans l'essai d'inactivation est comprise entre -0.5 et -2.5 après 30 min (-4,5 après 60 min pour le poliovirus) :
 - o la différence est de 2,000 log après 30 min d'inactivation par le formaldéhyde pour le Vaccinia virus
- Le produit testé n'affecte pas significativement la morphologie des cellules.
- Les conditions d'essai en saleté (3 g/L BSA + 3 mL/L EM) n'affectent pas l'infectivité du virus testé.
- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité des cellules au virus. Pour le Vaccinia virus, la différence est de 0,625 log.

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

7. CONCLUSION

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

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

8. ANNEXE 1

Vaccinia virus:

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

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

Tampons et milieux de culture:



- Tampon PBS: chlorure de sodium, Panreac, réf. 141659.1211, lot n° 0000204679; sodium phosphate dibasic, Sigma Aldrich, réf. S5136, lot n° BCBC7067V; sodium phosphate monobasic, Sigma Aldrich, réf. S5011, lot n° 1019K01021V
- MEM media, Sigma Aldrich, réf. 0268, lot n° 040M8301
- DMEM media, Sigma Aldrich, réf. D5796, lot n° RNBB9336
- Sérum de veau fœtal, Sigma Aldrich, F7524, lot n° 098K3397

Réactifs:

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

Solution d'inactivation :

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

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

9. ANNEXE 2

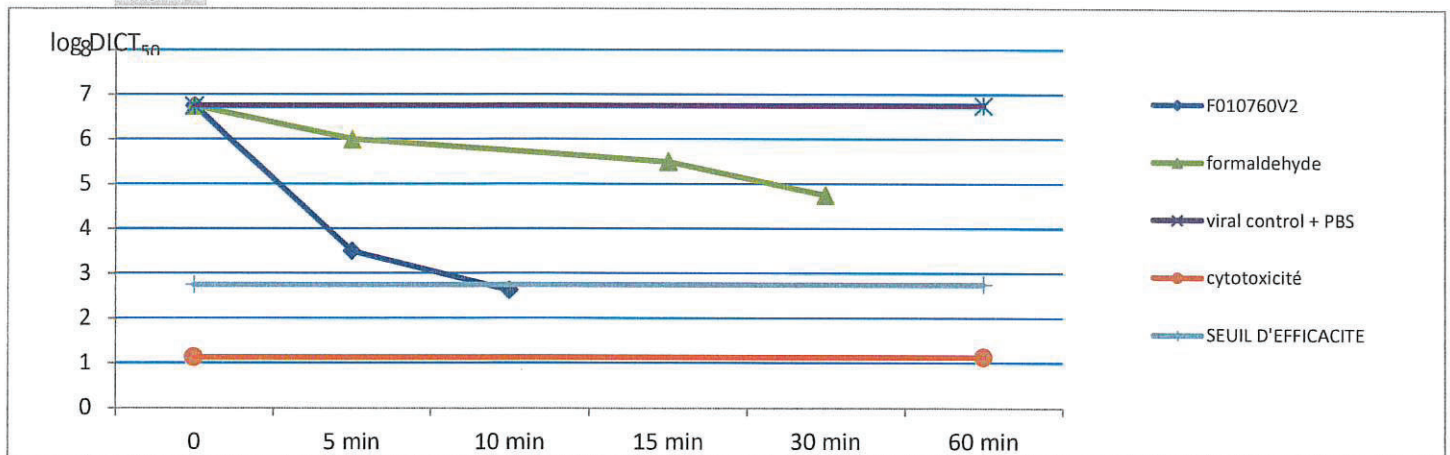
Table A1 – Titrage du Vaccinia virus par effet cytopathique, par la méthode de calcul Spearman-Kärber :

Log DICT₅₀ = 6,750

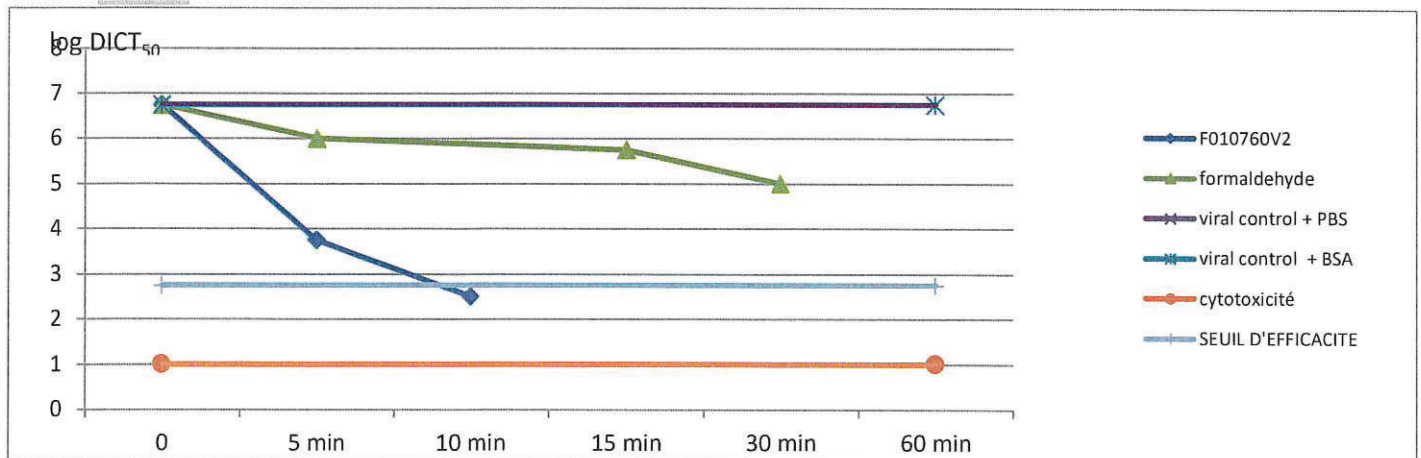
Dilution (- log)	Résultat	% résultats positifs
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	44444444	100
-6	44444444	100
-7	44000000	25
-8	00000000	0
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Somme des % de cultures positives		425

Figure 1 – représentations graphiques des résultats des essais :

ESSAI 1



ESSAI 2





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

Tableau A2— Résultats sur Vaccinia virus en conditions de saleté

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

Tableau A3 – Sensibilité des cellules au Vaccinia virus:

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





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

Tableau A4 — Résultats bruts

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

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

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

F2v1-EN14476.12-21



A l'attention de M CHARRAT / To M CHARRAT

Conformité aux Bonnes Pratiques de Laboratoire selon les Directives 2004/9/CE et 2004/10/CE, et selon la norme ISO 17025
Compliance with Good Laboratory Practices according to Directives 2004/9/CE and 2004/10/CE, and according to the ISO 17025 standard

Société (Company) : APEX BIOSOLUTIONS – 3 rue de la terre rouge– 25220 ROCHE LEZ BEAUPRE – FRANCE

- Vu la Directive 2004/9/CE du Parlement Européen et du Conseil du 11 février 2004 relative à l'inspection et la vérification des Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL),
Having regard to the Directive 2004/9/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 on the inspection and verification of good laboratory practice (GLP),
- Vu la Directive 2004/10/CE du Parlement Européen et du Conseil du 11 février 2004 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à l'application des principes de bonnes pratiques de laboratoire et au contrôle de leur application pour les essais sur les substances chimiques,
Having regard to the Directive 2004/10/EC of the European parliament and of the council of 11 February 2004 on the harmonisation of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances,
- Vu la Directive 93/88/CEE du Conseil du 12 octobre 1993 modifiant la directive 90/679/CEE concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail,
Having regard to the Council Directive 93/88/EEC of 12 October 1993 amending Directive 90/679/EEC on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work,
- Vu la norme ISO/IEC 17025 :2017 concernant les exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais,
Having regard to the ISO/IEC 17025:2017 standard relating to general requirements for the competence of testing and calibration laboratories,

APEX BIO SOLUTIONS effectue les essais suivants conformément aux principes des BPL et de la norme ISO 17025 :

APEX BIO SOLUTIONS staff works in accordance with the principles of GLP and ISO 17025 standard in the following area:

- Etude d'efficacité biocides sur agents microbiologiques de niveau 1 et 2
- *Tests Methods and Efficacy testing of Biocides on Microbial agents Level 1 & 2*

ROCHE LEZ BEAUPRE, le 11 janvier 2024 / January, the 11th 2024

Stephanie MOROT-BIZOT

Docteur en microbiologie / PhD in microbiology

Expert member (AFNOR T72Q and CEN/TC 216/WG1 « Human Medicine », WG2 "veterinary field" and WG3 « Food Hygiene and Domestic and Institutional Use »)

A l'attention de M CHARRAT / To M CHARRAT

Conformité aux Bonnes Pratiques de Laboratoires selon les Directives 2004/9/CE et 2004/10/CE, et selon la norme ISO 17025.

Compliance with Good Laboratory Practices according to Directives 2004/9/CE and 2004/10/CE, and according to the ISO 17025 standard.

- Vu la Directive 2004/9/CE du Parlement Européen et du Conseil du 11 février 2004 relative à l'inspection et la vérification des Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL),
Having regard to the Directive 2004/9/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 on the inspection and verification of good laboratory practice (GLP),
- Vu la Directive 2004/10/CE du Parlement Européen et du Conseil du 11 février 2004 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à l'application des principes de bonnes pratiques de laboratoire et au contrôle de leur application pour les essais sur les substances chimiques,
Having regard to the Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 of the harmonisation of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances,
- Vu la Directive 93/88/CEE du Conseil du 12 octobre 1993 modifiant la Directive 90/679/CEE concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail,
Having regard to the Council Directive 93/88/EEC of 12 October 1993 amending Directive 90/679/EEC on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work,
- Vu la norme ISO/IEC 17025 : 2017 concernant les exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais,
Having regard to the ISO/IEC 17025 : 2017 standard relating to general requirements for the competence of testing and calibration laboratories,

Le laboratoire d'Hygiène Hospitalière effectue les essais suivants conformément aux principes des BPL et de la norme ISO 17025 :

The hospital hygiene laboratory staff works in accordance with the principles of GLP and ISO 17025 standard in the following area :

- Etude d'efficacité biocides sur agents microbiologiques de niveau 1 et 2
- Tests Methods and Efficacy testing of Biocides on Microbial agents Level 1 and 2

Clermont-Ferrand, le 17 janvier 2024

C.H.U. de Clermont-Ferrand
Pr Ousmane TRAORE
Hygiène Hospitalière
Professeur OUSMANE TRAORE
Chef de service d'Hygiène Hospitalière

