

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-9
Fabricant : Franklab
Diluant du produit dont l'utilisation est recommandée par le fabricant : Eau potable (Produit utilisé dilué)
Substance(s) active(s) : Non spécifié
Date de livraison du produit : 08/02/2017
Date de péremption : Non renseigné
Période d'analyse : Du 22/02/2017 au 27/02/2017

Résultats d'essai (Répétition n°1)

EN : 13624 (Phase 2, étape 1)

Nom du produit : DDN-9
N° Lot : 5487
Fabricant : Franklab
Aspect du produit : Liquide, incolore
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 : Polysorbate 80 : 30g, Lécithine d'œuf : 3g, Histidine HCl : 1g, Peptone pancréatique de caséine : 1g, Chlorure de sodium : 4,3g, Phosphate monopotassique : 3,6g, Phosphate disodique dihydraté : 7,2g, Thiosulfate de sodium : 5g, Eau purifiée : qsp 1L
Gélose utilisée : GEM Sans peptone
Température d'essai : 20°C ± 1°C
Substances interférentes : **Conditions de Saleté (BSA 3 g/L + GRm 3ml/L)**
Souche d'essai : *Candida albicans* IP 48.72
Température d'incubation : 30°C ± 1°C
Date de l'essai : 22/02/2017
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} | 58 | $\bar{x} = 64$ | V _{c1} | 54 | $\bar{x} = 63$ | V _{c1} | 71 | $\bar{x} = 59$ | V _{c1} | 67 | $\bar{x} = 62$ | |
| V _{c2} | 69 | | V _{c2} | 71 | | V _{c2} | 47 | | V _{c2} | 56 | | |
| 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"/> | |
| Suspension de validation (N _{vb}), 10 ⁻³ | | | V _{c1} | 80 | $\bar{x} = 75$ | 30 ≤ \bar{x} de N _{vb} / 1000 ≤ 160 ? | | | Oui | <input checked="" type="checkbox"/> | Non | <input type="checkbox"/> |
| | | | V _{c2} | 70 | | Oui | <input checked="" type="checkbox"/> | Non | <input type="checkbox"/> | | | |

V_c : Nombre d'UFC comptées/ml ; N : Nombre d'UFC dans la suspension d'essai ; N₀ : Nombre d'UFC dans le mélange d'essai ; N_a : Nombre d'UFC dénombrées après contact avec le produit ; N_{vo} : Nombre d'UFC/ml dans la dilution de la suspension de validation ; R : Réduction du nombre de bactéries. Inc : Incomptable
 Comme indiqué dans la norme, la concentration du produit utilisée pour valider la norme est la concentration la plus élevée étudiée soit ici 1%.

Suspension d'essai et Essai

| | | | | | | |
|---|------------------|-----------------|-----------------|--|-------------------------------------|--------------------------|
| Suspension d'essai (N et N ₀) | N | V _{c1} | V _{c2} | $N = (286 + 312 + 40 + 35) / 2,2 \times 10^{-5} = 7,49 \log$ $N_0 = N/10 = 6,49 \log$ N_0 est compris entre 6,17 et 6,70 | Oui | Non |
| | 10 ⁻⁵ | 286 | 312 | | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | 10 ⁻⁶ | 40 | 35 | | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

| Concentration / temps de contact | Facteur de dilution | V _{c1} | V _{c2} | N _a = $\bar{x} \times 10$ | Log N _a | Log R (N ₀ = 6,49) |
|----------------------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| 1% 5 minutes | 10 ⁰ | 0 | 0 | <140 | <2,15 | >4,24 |
| | 10 ⁻¹ | 0 | 0 | | | |
| 0,5% 5 minutes | 10 ⁰ | 0 | 0 | <140 | <2,15 | >4,24 |
| | 10 ⁻¹ | 0 | 0 | | | |
| 0,25% 5 minutes | 10 ⁰ | 100 | 95 | 975 | 2,99 | 3,40 |
| | 10 ⁻¹ | 10 | 13 | | | |
| 0,125% 5 minutes | 10 ⁰ | Inc | Inc | >66000 | >4,82 | <1,57 |
| | 10 ⁻¹ | >660 | >660 | | | |

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 : $D = [(286 + 312) / 2] / [(40 + 35) / 2] = 7,97$
 7,97 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.

Résultats d'essai (Répétition n°2)

EN : 13624 (Phase 2, étape 1)

Nom du produit : DDN-9

N° Lot : 5487

Fabricant : Franklab

Aspect du produit : Liquide, incolore

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 : Polysorbate 80 : 30g, Lécithine d'œuf : 3g, Histidine HCl : 1g, Peptone pancréatique de caséine : 1g, Chlorure de sodium : 4,3g, Phosphate monopotassique : 3,6g, Phosphate disodique dihydraté : 7,2g, Thiosulfate de sodium : 5g, Eau purifiée : qsp 1L

Gélose utilisée : GEM Sans peptone

Température d'essai : 20°C ± 1°C

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

Souche d'essai : *Candida albicans* IP.48.72

Température d'incubation : 30°C ± 1°C

Date de l'essai : 22/02/2017

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} | 44 | $\bar{x} = 40$ | V _{c1} | 31 | $\bar{x} = 27$ | V _{c1} | 28 | $\bar{x} = 30$ | V _{c1} | 21 | $\bar{x} = 23$ |
| V _{c2} | 35 | | V _{c2} | 22 | | V _{c2} | 31 | | V _{c2} | 25 | |
| 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"/> |
| Suspension de validation (N _{vB}), 10 ⁻³ | | | V _{c1} | 28 | $\bar{x} = 31$ | 30 ≤ \bar{x} de N _{vB} / 1000 ≤ 160 ? | | | | | |
| | | | V _{c2} | 34 | | Oui | <input checked="" type="checkbox"/> | Non | <input type="checkbox"/> | | |

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

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

Suspension d'essai et Essai

| | | | | | |
|---|------------------|-----------------|-----------------|--|--|
| Suspension d'essai (N et N ₀) | N | V _{c1} | V _{c2} | $N = (154 + 151 + 20 + 13) / 2,2 \times 10^{-5} = 7,19 \log$ $N_0 = N/10 = 6,19 \log$ N_0 est compris entre 6,17 et 6,70 | Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> |
| | 10 ⁻⁵ | 154 | 151 | | |
| | 10 ⁻⁶ | 20 | 13 | | |

| Concentration / temps de contact | Facteur de dilution | V _{c1} | V _{c2} | N _a = $\bar{x} \times 10$ | Log N _a | Log R (N ₀ = 6,19) |
|----------------------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| 1% 5 minutes | 10 ⁰ | 0 | 0 | <140 | <2,15 | >4,04 |
| | 10 ⁻¹ | 0 | 0 | | | |
| 0,5% 5 minutes | 10 ⁰ | 0 | 0 | <140 | <2,15 | >4,04 |
| | 10 ⁻¹ | 0 | 0 | | | |
| 0,25% 5 minutes | 10 ⁰ | 38 | 40 | 390 | 2,59 | 3,60 |
| | 10 ⁻¹ | 7 | 4 | | | |
| 0,125% 5 minutes | 10 ⁰ | Inc | Inc | >66000 | >4,82 | <1,37 |
| | 10 ⁻¹ | >660 | >660 | | | |

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 : $D = [(154 + 151) / 2] / [(20 + 13) / 2] = 9,64$
 9,64 est compris entre 5 et 15.

Remarques à propos des résultats

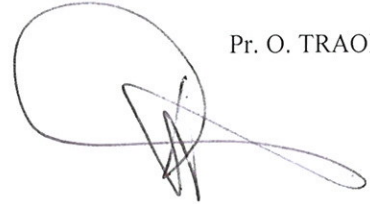
- ✓ Tous les témoins et le mélange de validation de la méthode donnent des valeurs comprises à l'intérieur des limites de base.
- ✓ Une concentration du produit au moins a présenté une réduction logarithmique d'au moins 4 log.
- ✓ Absence de précipité lors de l'essai.

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 0,5% est de $1,38.10^4$ soit 4,14 log.

Conformément à la norme EN 13624 (2013), le lot 5487 du produit DDN-9, lorsqu'il est concentré à 0,5% (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 3ml/L), vis-à-vis de la souche référencée *Candida albicans* pour une activité de désinfection d'instruments.

Clermont-Ferrand, le 28/03/2017.



Pr. O. TRAORÉ

RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE LEVURICIDE DU
PRODUIT DDN9 SELON LA NORME EN 14562**

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



Demande d'essai du: 12/05/2015

Références du dossier d'analyses: n° n°140D10-2015-07

ESSAI DE LEVURICIDIE:

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

Essai sur une souche : *Candida albicans*.

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

Date d'émission : 24/06/2015

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

Professeur Georges HERBEIN
Professeur des Universités Médecin Hospitalier
Expert scientifique

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

| Echantillon | N° lot |
|-------------|---------|
| DDN9 | 4227B02 |

Echantillons reçus au laboratoire le 22/05/2015.

Date limite d'utilisation optimale: non précisé

Fabricant: FRANKLAB

Date de fabrication: non précisé

Conditions de stockage: Température ambiante et obscurité

Composants actifs: ammoniums quaternaires.

Aspect: liquide transparent

Diluant préconisé par le fabricant: eau potable.

Période de l'étude: du 28/05/2015 au 03/06/2015

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Concentrations du produit soumis à l'essai : 0.5%
- Méthode employée: EN 14562
- Temps de contact: 10 minutes, 15 minutes et 60 minutes
- Température d'essai: 20°C
- Substance interférente: albumine bovine (3g/l) et érythrocytes de mouton (3 mL/L), conditions de saleté.
- Diluant des suspensions fongiques et des essais : solution tryptone sel stérile pour les dénombrements et neutralisant pour les essais.
- Souche utilisée : *Candida albicans* CIP 48.72 lot 265.09

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

fixe - EN 14562 - C. albicans - stab - 11.2015

- Conditions de culture: sur GEM (Gélose à l'Extrait de Malt), à 30°C ± 1°C.
- Technique d'arrêt de l'action levuricide: transfert du porte germe dans 10 ml de neutralisant à base de polysorbate 80, de saponine et de jaune d'œuf (composition en annexe).

4. RESULTATS PROPREMENT DITS

Voir feuilles de résultats.

SYNTHESE RESULTATS

Le produit **DDN9** est bien actif vis-à-vis des souches de référence utilisées, car la réduction moyenne obtenue est supérieure à 4 log pour les cellules bactériennes viables :

- Pour *C.albicans*, R > 4,15 à 0,5% de produit, 15 min de contact

5. CONCLUSION

Conformément à la norme EN 14562 (Septembre 2006), le produit DDN9 lot n°4227B02:

- a une activité levuricide sur la souche de référence lorsqu'employé à 0,5%, pour 15 min de contact à 20°C, en conditions de saleté (3 g/l d'albumine bovine finaux + érythrocytes de mouton).



FEUILLE 1 DE RESULTATS DES ESSAIS EN CONDITIONS DE SALETE
***Candida albicans* (essai)**

Norme employée: EN 14562, phase 2 étape 2

Nom du produit : DDN9

N° de lot: 4227B02

Méthode par dilution-neutralisation dénombrement en profondeur
 dénombrement en surface
 nombre de boîtes/ml : 1

Neutralisant : polysorbate 80 (30 g/l) ; saponine (30 g/l), jaune d'œuf frais (5%).

Température d'essai : 20°C.

Substance interférente : albumine bovine à 3 g/l et érythrocytes de mouton à 3 mL/L

Micro-organisme d'essai : *Candida albicans* CIP 48.72 lot 265.09

Température d'incubation : 30°C ± 1°C

N° de l'essai 140D10-2015-07

Date de l'essai : 02/06/2015

Personne responsable : Stéphanie MOROT-BIZOT

Signature :



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

Aspect des solutions d'essai du produit : limpide

Validation et contrôles

| | Suspension de validation Nv0 | | Témoin des conditions expérimentales A | | Témoin du neutralisant B | | Validation de la méthode C | |
|-----|---|-----------|---|-----------|---|-----------|---|-----------|
| | | \bar{x} | | \bar{x} | | \bar{x} | | \bar{x} |
| Vc1 | 50 | \bar{x} | 50 | \bar{x} | 48 | \bar{x} | 46 | \bar{x} |
| Vc2 | 51 | 50,5 | 51 | 50,5 | 47 | 47,5 | 45 | 45,5 |
| | 30 ≤ \bar{x} de Nv0 ≤ 160 x oui <input type="checkbox"/> non | | \bar{x} de A est ≥ 0,5 × \bar{x} de Nv0 x oui <input type="checkbox"/> non | | \bar{x} de B ≥ 0,5 × \bar{x} de Nv0 x oui <input type="checkbox"/> non | | \bar{x} de C ≥ 0,5 × \bar{x} de Nv0 x oui <input type="checkbox"/> non | |

Suspension d'essai et essai

| Suspension d'essai (N) | | | log N | N |
|------------------------|-----|-----|-------|-------------------|
| 10^{-6} | 224 | 212 | 8,35 | $2,24 \cdot 10^8$ |
| 10^{-7} | 25 | 26 | | |
| 8,17 ≤ log N ≤ 8,70? | | | | |
| 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

| Témoin eau (Nw) | | | log Nw |
|---------------------------|-----|-----|--------|
| 10^{-4} | 190 | 201 | 6,29 |
| 6,15 ≤ log Nw ≤ lg N-1,3? | | | |
| x oui □ non | | | |

| | Essais à 0,50% | | | | | |
|-------------------------|----------------|----|-------------|----|-----------------|---|
| | 10 min | | 15 min | | 60 min | |
| 10^0 | 30 | 39 | 18 | 12 | 0 | 0 |
| 10^{-1} | 6 | 4 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 10^{-2} | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10^{-3} | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| log Na | 2,54 | | 2,18 | | <2,15 | |
| log R = log Nw - log Na | 3,75 | | 4,12 | | >4,15 | |

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 Nw - lg Na)

FEUILLE 2 DE RESULTATS DES ESSAIS EN CONDITIONS DE SALETE
***Candida albicans* (répétition)**

Norme employée: EN 14562, phase 2 étape 2

Nom du produit : DDN9

N° de lot: 4227B02

Méthode par dilution-neutralisation dénombrement en profondeur
 dénombrement en surface
 nombre de boîtes/ml : 1

Neutralisant : polysorbate 80 (30 g/l) ; saponine (30 g/l), jaune d'œuf frais (5%).

Température d'essai : 20°C.

Substance interférente : albumine bovine à 3 g/l et érythrocytes de mouton à 3 mL/L

Micro-organisme d'essai : *Candida albicans* CIP 48.72 lot 265.09

Température d'incubation : 30°C ± 1°C

N° de l'essai 140D10-2015-07

Date de l'essai : 03/06/2015

Personne responsable : Stéphanie MOROT-BIZOT

Signature :

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

Aspect des solutions d'essai du produit : limpide

Validation et contrôles

| | Suspension de validation Nv0 | | Témoin des conditions expérimentales A | | Témoin du neutralisant B | | Validation de la méthode C | |
|-----|---|-----------|---|-----------|---|-----------|---|-----------|
| | | \bar{x} | | \bar{x} | | \bar{x} | | \bar{x} |
| Vc1 | 59 | \bar{x} | 57 | \bar{x} | 55 | \bar{x} | 54 | \bar{x} |
| Vc2 | 63 | 61 | 60 | 58,5 | 55 | 55 | 60 | 57 |
| | 30 ≤ \bar{x} de Nv0 ≤ 160 x oui <input type="checkbox"/> non | | \bar{x} de A est ≥ 0,5 × \bar{x} de Nv0 x oui <input type="checkbox"/> non | | \bar{x} de B ≥ 0,5 × \bar{x} de Nv0 x oui <input type="checkbox"/> non | | \bar{x} de C ≥ 0,5 × \bar{x} de Nv0 x oui <input type="checkbox"/> non | |

Suspension d'essai et essai

| Suspension d'essai (N) | | | log N | N |
|------------------------|-----|-----|-------|----------------------|
| 10 ⁻⁶ | 234 | 230 | 8,37 | 2,34.10 ⁸ |
| 10 ⁻⁷ | 25 | 21 | | |
| 8,17 ≤ log N ≤ 8,70? | | | | |
| x oui □ non | | | | |

Vérifications de la méthodologie:

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

| Témoin eau (Nw) | | | log Nw |
|---------------------------|-----|-----|--------|
| 10 ⁻⁴ | 201 | 223 | 6,33 |
| 6,15 ≤ log Nw ≤ lg N-1,3? | | | |
| x oui □ non | | | |

| | Essais à 0,50% | | | | | |
|-------------------------|----------------|----|-----------------|----|-----------------|---|
| | 10 min | | 15 min | | 60 min | |
| 10 ⁰ | 41 | 39 | 10 | 12 | 0 | 0 |
| 10 ⁻¹ | 5 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 10 ⁻² | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 ⁻³ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| log Na | 2,60 | | <2,15 | | <2,15 | |
| log R = log Nw - log Na | 3,72 | | >4,18 | | >4,18 | |

Légende :

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

Favi - EN 14562 - C.albicans - stab - M.815

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

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

SUBSTANCES INTERFÉRENTES :

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

DILUANT

Solution Tryptone-Sel (TS)

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

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

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

NEUTRALISANTIngrédients par litre d'eau distillée:

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

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

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

Solution A: - MgCl₂ anhydre, réf. M8266, lot n° 108K0068, SIGMA ALDRICH
 - CaCl₂ anhydre, réf. C1016, lot n° 059K0030, SIGMA ALDRICH

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

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

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

Fini - EN 14562 - C. d'Albion - stab - 11.2015

RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE VIS-A-VIS DU
VIRUS DBV (MODELE HCV) DU PRODUIT DDN 9**

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°061D04-2017-01

ESSAIS DE VIRUCIDIE:

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

Essais sur le virus DBV (Diarrhée Bovine Virale), virus modèle de l'hépatite C, d'un échantillon de produit désinfectant, le produit DDN9.

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

Date d'émission : 09/05/2017

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

Professeur Georges HERBEIN
Professeur des Universités Médecin Hospitalier
Expert scientifique

SOMMAIRE

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

1 LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES ESSAIS

APEX BIOSOLUTIONS
18, rue Alain SAVARY
25000 BESANÇON
FRANCE

2 IDENTIFICATION COMPLETE DES ECHANTILLONS

DDN 9

Numéro de lot: n° 5592
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 incolore
Diluant préconisé par le fabricant: eau potable
Date de réception au laboratoire: 18/04/2017
Période de l'étude: 19/04/2017 au 09/05/2017

3 CONDITIONS EXPERIMENTALES

Température d'essai: 20°C ± 1°C
Méthode de titrage: virus titré en log DICT₅₀
Temps de contact: 5 minutes, 15 minutes et 60 min
Concentration cible: 0,5%
Diluant du produit utilisé lors des essais: eau dure
Souche de virus testée: virus DBV, cultivé sur cellules BT, à 37°C, sous 5% CO₂
Substance interférente: 3 g/l de sérum albumine bovine + 3 ml érythrocytes de mouton
Stabilité du produit en présence de substance interférente: bonne
Technique d'arrêt de l'action virucide: à froid

Titre viral :

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

4 VALIDATION DE LA METHODE

a) Méthodologie

Le produit DDN 9 a été testé sur des cultures de cellules BT et une faible cytotoxicité a été observée (jusqu'à la dilution 10^{-2}).

b) Sensibilité des cellules aux virus

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

| Dilution produit | | Titre de virus (log DICT ₅₀) | | |
|------------------|-----------|---|---|---|
| | | Suspension virale sur cellules non traitées | Suspension virale sur cellules traitées | Différence de titre viral (log DICT ₅₀) |
| DDN 9 | 10^{-3} | 7,000 | 6,625 | 0,375 |

La différence de titre viral doit être inférieure à 1,0 log. Le produit DDN 9 testé à la concentration indiquée ci-dessus ne montre pas d'influence sur la méthode de titrage du virus DBV.

c) Validations de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit DDN9:

| Concentration du produit | Substances interférentes | Titre de virus (log DICT ₅₀) | Différence avec la suspension virale d'essai |
|--------------------------|--|--|--|
| DDN 9 0,5% | 3 g/l de sérum albumine bovine + 3 ml érythrocytes de mouton | Essai 1: 7,125 | 0,125 |
| | | Essai 2: 7,125 | 0,125 |

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

d) Essai d'inactivation de référence

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

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

5 ESSAIS PROPRESMENT DITS – CALCUL DE L'ACTIVITE VIRUCIDE

Essai 1

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

| PRODUIT | Concentration (v/v) | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai (log DICT_{50}) | Réduction du titre viral |
|---------|---------------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| DDN 9 | 0,5% | 5 min | 20°C | 5,750 | 1,375 |
| | | 15 min | | 3,000 | 4,125 |
| | | 60 min | | 2,500 | 4,625 |

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

Essai 2

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

| PRODUIT | Concentration (v/v) | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai (log DICT_{50}) | Réduction du titre viral |
|---------|---------------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| DDN 9 | 0,5% | 5 min | 20°C | 5,750 | 1,375 |
| | | 15 min | | 3,000 | 4,125 |
| | | 60 min | | 2,500 | 4,625 |

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

6 VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE

Les essais réalisés satisfont aux critères de validation car:

- Le titre de la suspension virale d'essai est suffisamment important pour permettre une observation de réduction de 4 log après essais; il est de $7,0 \log \text{DICT}_{50}$ pour le virus DBV.
- La différence des titres entre témoin viral et virus de référence dans l'essai d'inactivation est comprise entre -0.5 et -2.5 après 30 min; la différence est de 1,375 logs après 30 min d'inactivation par le formaldéhyde pour le virus DBV.
- Le produit testé n'affecte pas significativement la morphologie des cellules.
- Les conditions d'essai en saleté (3 g/l de sérum albumine bovine + 3 ml érythrocytes de mouton) n'affectent pas l'infectivité du virus
- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité des cellules au virus DBV. Les titres de virus mis en contact avec les cellules traitées avec le produit et les cellules non traitées ont une différence inférieure à 1,0 log (la différence est de 0,375 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 DDN 9 est inférieure à 0,5 log (0,125 log DICT₅₀ essai 1 et 0,125 log DICT₅₀ essai 2)

7 CONCLUSION

Les essais réalisés sur le produit DDN 9 lot n° 5592 ont démontré:

- que le produit **DDN 9** employé à 0.5 %, a une activité virucide sur le virus DBV, (et donc par extension sur le virus de l'hépatite C) selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A1, pour 15 minutes de contact à 20°C, en conditions de saleté.



ANNEXE 1

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

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

Tampons et milieux de culture:

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

Réactifs:

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

Solution d'inactivation:

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

EAU DURE

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

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

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

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

ANNEXE 2

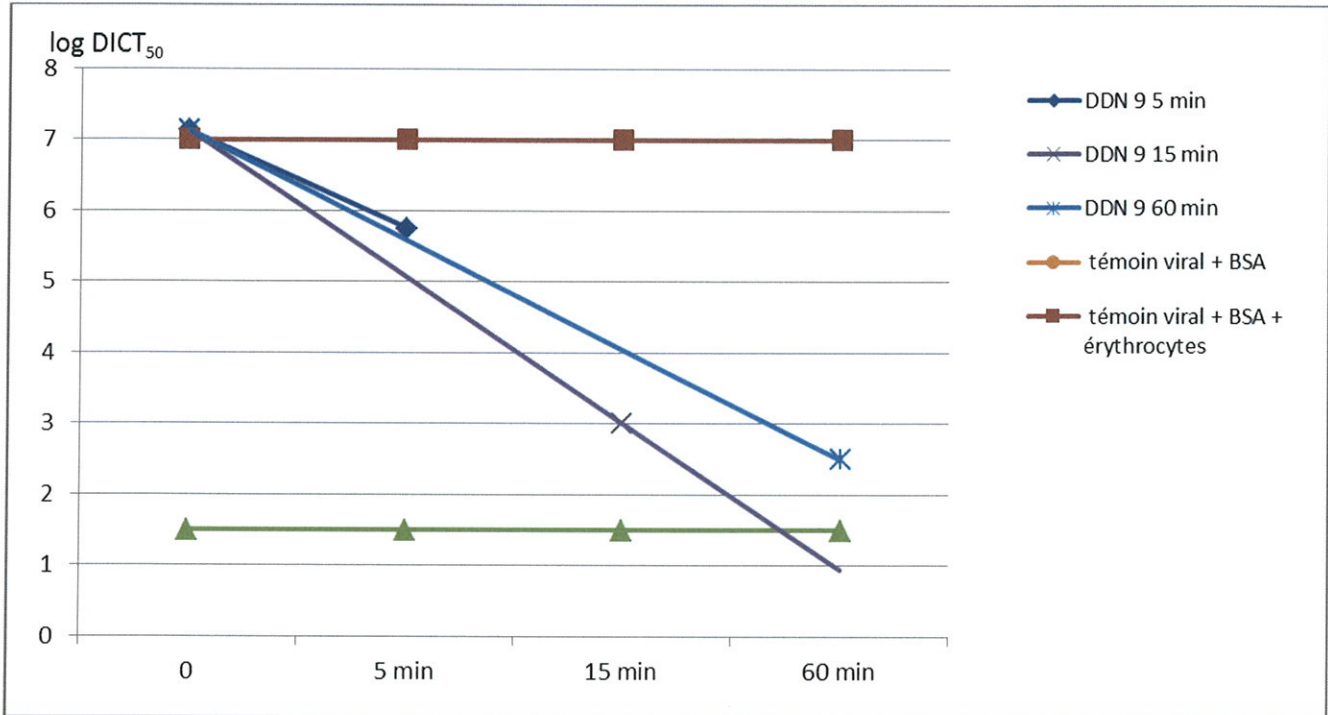
Tableau A1 - Titrage du virus DBV par effet cytopathique, par la méthode de calcul Spearman-Kärber :

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

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

Figure 1 – représentations graphiques des résultats des essais :

Essai 1



Essai 2

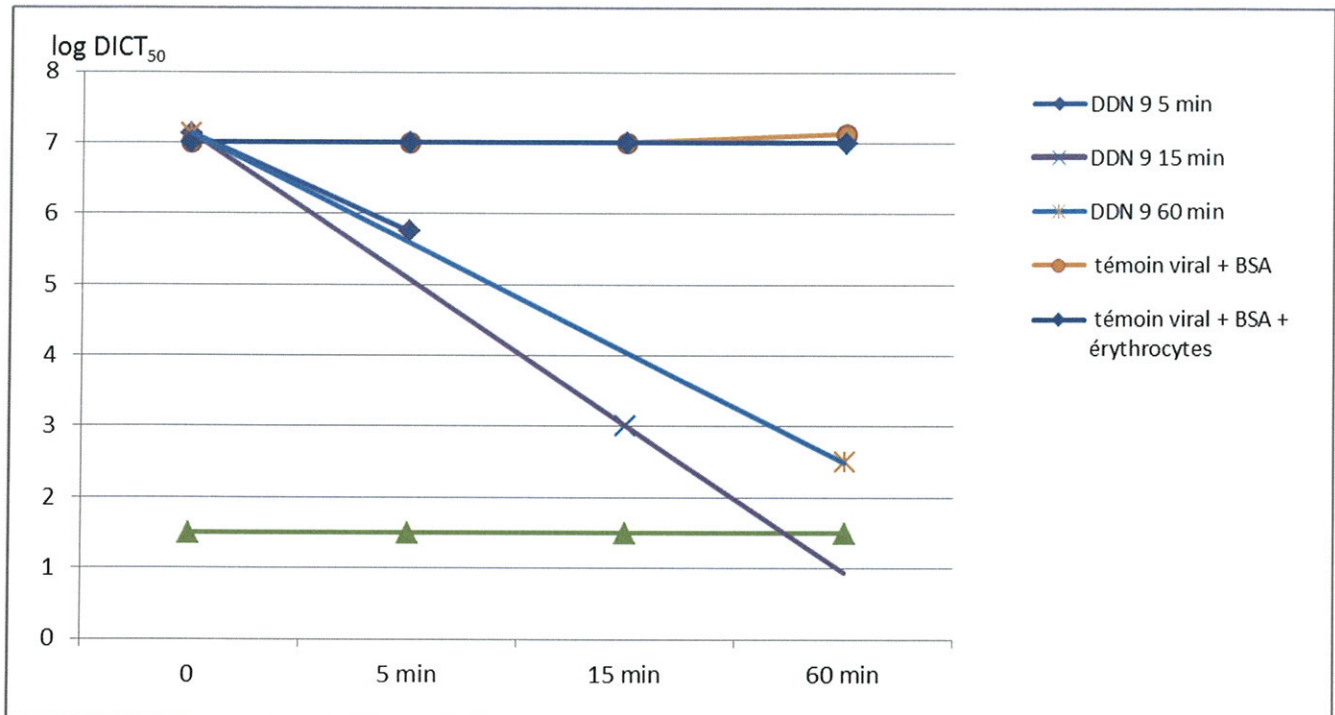


Fig. 1 - EN 14476 - 05.2017

Tableau A2 — Tableau des résultats du produit DDN 9 et du virus DBV dans des conditions de saleté (3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes)

| Produit | Concentration | substance interférente | niveau de cytotoxicité | Lg DICT ₅₀ | | | | | Réduction |
|-----------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------|-------|--------|--------|--------|------------------|
| | | | | 0 | 5 min | 15 min | 30 min | 60 min | |
| DDN 9 essai 1 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 1,5 | 7,125 | 5,75 | 3 | N.T. | 2,5 | R 15 min = 4,125 |
| DDN 9 essai 2 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 1,5 | 7,125 | 5,75 | 3 | N.T. | 2,5 | R 15 min = 4,125 |
| Formaldéhyde | 0,70% | PBS | 2,375 | 7,125 | 6,625 | 6 | 5,75 | N.T. | |
| contrôle d'infectivité essai 1 | N.A. | PBS | N.A | 7 | N.T. | N.T. | N.T. | 7 | |
| | N.A. | 3 g/l BSA | N.A | 7 | N.T. | N.T. | N.T. | 7 | |
| | N.A. | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | N.A | 7 | N.T. | N.T. | N.T. | 7 | |
| contrôle d'infectivité essai 2 | N.A. | PBS | N.A | 7 | N.T. | N.T. | N.T. | 7,125 | |
| | N.A. | 3 g/l BSA | N.A | 7 | N.T. | N.T. | N.T. | 7 | |
| | N.A. | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | N.A | 7 | N.T. | N.T. | N.T. | 7 | |
| sensibilité des cellules au virus | DDN 9 | N.A. | cellules non traitées | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | 7 | |
| | 10 ⁻³ | N.A. | cellules traitées | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | 6,625 | |

Tableau A3 — Données brutes pour le produit DDN 9 avec 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes soumis à essai contre le virus DBV (titrage par effet cytopathique ; 8 puits)

Essai 1

| | Concentration | substance interfé- rente | temps de con- tact | Dilutions | | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------|----------------------------------|-----------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | |
| DDN 9 essai 1 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 15 min | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | contrôle viral | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 2111 | 1111 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 1000 | 0000 | |
| | | 3 g/l BSA | 15 min | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| contrôle viral | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 2111 | 1111 | 0000 | | | | |
| | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 1000 | 0000 | | | | |
| DDN 9 essai 1 cytotoxicité | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | N.A. | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| contrôle viral d'infectivité | N.A. | PBS | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1133 | 1221 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 3111 | 0000 | 0000 | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 1111 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 3331 | 0000 | 0000 | |
| | N.A. | 3 g/l BSA | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1112 | 2112 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 2311 | 0000 | 0000 | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1112 | 1111 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1332 | 0000 | 0000 | |
| | N.A. | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 1111 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1121 | 0000 | 0000 | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1113 | 1110 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1122 | 1000 | 0000 | |
| Formaldéhyde | 0,70% | PBS | 5 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1122 | 1000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 2222 | 0000 | 0000 | |
| | | | 15 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 2332 | 1111 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 2222 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | 30 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1221 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 1100 | 0000 | 0000 | |
| Formaldéhyde (cytotoxicité) | 0,70% | PBS | N.A. | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | |
| | | | | 4444 | 1110 | 0000 | 0000 | | | | | |

Essai 2

| | Concentration | substance interférente | temps de contact | Dilutions | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------|----------------------------------|------------------|----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | | | |
| DDN 9 essai 2 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 15 min | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| | | | contrôle viral | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 1333 | 1111 | 0000 | | |
| | | 3 g/l BSA | 15 min | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | contrôle viral | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 1122 | 1111 | 0000 | 0000 | |
| | | DDN 9 essai 2 cytotoxicité | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | N.A. | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | | | | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| contrôle viral d'infectivité | N.A. | PBS | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 2211 | 1111 | 0000 | 0000 | | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 2211 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 2211 | 1111 | 0000 | 0000 | | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 2221 | 1000 | 0000 | 0000 | | |
| | N.A. | 3 g/l BSA | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 2111 | 1111 | 0000 | 0000 | | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 1111 | 0000 | 0000 | | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| | N.A. | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 1111 | 0000 | 0000 | | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1133 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 2112 | 1112 | 0000 | 0000 | | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| Formaldéhyde | 0,70% | PBS | 5 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 2222 | 1000 | 0000 | 0000 | | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1122 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| | | | 15 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 3331 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| | | | 30 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 2221 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 1100 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| Formaldéhyde (cytotoxicité) | 0,70% | PBS | N.A. | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | | | |
| | | | | 4444 | 1110 | 0000 | 0000 | | | | | | | |

Validations avec autres concentrations testées :

| | Concentration | substance interférente | temps de contact | dilutions | | | | | | | |
|-------|---------------|----------------------------------|------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 |
| DDN 9 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 5 min | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 1100 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | 60 min | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |

| | Concentration | substance interférente | temps de contact | Log TCID ₅₀ | | Réduction | |
|-------|---------------|----------------------------------|------------------|------------------------|-------|-----------|----------|
| | | | | 0 | 5 min | | |
| DDN 9 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 5 min | 7,125 | 5,75 | 1,375 | inactive |
| | | | 60 min | 7,125 | 2,5 | 4,625 | active |

Sensibilité des cellules au virus :

| Produit | dilution | substance interférente | | Dilutions | | | | | | |
|---------|------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------|------|------|-------|------|------|------|
| | | | | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 |
| DDN 9 | 10 ⁻³ | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | Cellules non traitées | 4444 | 4444 | 4444 | 2211 | 1111 | 1111 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 2222 | 1111 | 0000 | 0000 |
| | | | Cellules traitées | 4444 | 4444 | 3222 | 1 111 | 1111 | 1000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4444 | 2222 | 1111 | 1111 | 0000 | 0000 |

RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE VIS-A-VIS DU
VIRUS HIV DU PRODUIT DDN 9**

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°061D04-2017-12

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 9.

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 9

Numéro de lot: n° 5592
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 incolore
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: 0,5%
Diluant du produit utilisé lors des essais: eau dure
Souche de virus testée: VIH-1 souche pNL4-3Luc, cultivé sur cellules lymphoïdes IG5, 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 9 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 9 10^{-1} | 6,500 | 6,125 | 0,375 |

La différence de titre viral doit être inférieure à 1,0 log. Le produit DDN 9 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 9:

| Concentration du produit | Substances interférentes | Titre de virus (log URL/mg) | Différence avec la suspension virale d'essai |
|--------------------------|--|-----------------------------|--|
| DDN 9 0,5% | 3 g/l de sérum albumine bovine + 3 ml érythrocytes de mouton | Essai 1: 6,500 | 0,000 |
| | | Essai 2: 6,500 | 0,000 |

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

d) Essai d'inactivation de référence

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

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

5 ESSAIS PROPRESMENT DITS – CALCUL DE L'ACTIVITE VIRUCIDE

Essai 1

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

| PRODUIT | Concentration (v/v) | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai (log URL/mg) | Réduction du titre viral |
|---------|---------------------|------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| DDN 9 | 0,5% | 5 min | 20°C | 4,500 | 2,000 |
| | | 15 min | | 2,375 | 4,125 |
| | | 60 min | | 1,375 | 5,125 |

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 9 | 0,5% | 5 min | 20°C | 4,500 | 2,000 |
| | | 15 min | | 2,250 | 4,250 |
| | | 60 min | | 1,375 | 5,125 |

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

6 VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE

Les essais réalisés satisfont aux critères de validation car:

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

- La différence de titre entre l'essai de suspension virale et le contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit DDN 9 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 9 lot n°5592 ont démontré:

- que le produit **DDN 9** employé à 0.5 %, 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 fœtal, Sigma Aldrich, F7524, lot n° 098K3397

Réactifs:

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

Solution d'inactivation:

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

EAU DURE

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

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

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

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

ANNEXE 2

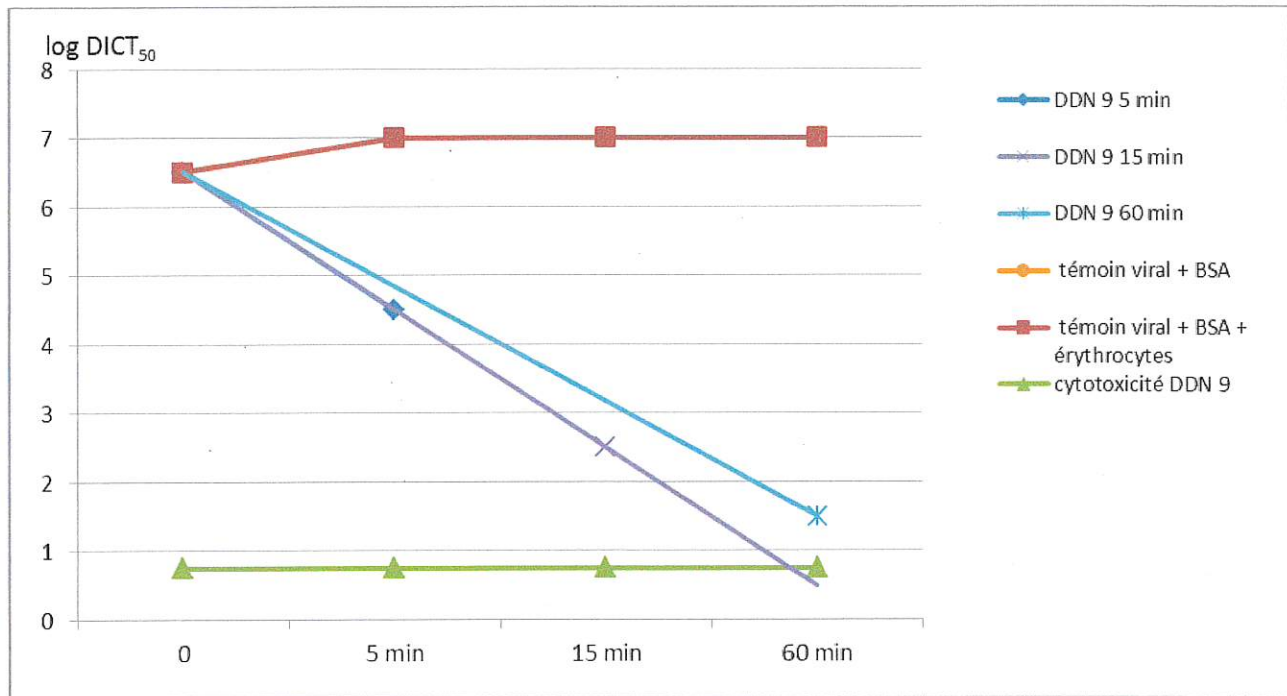
Tableau A1 - Titrage du virus HIV par effet cytopathique, par la méthode de calcul Spaerman-Kärber :

log URL/mg = 6,500

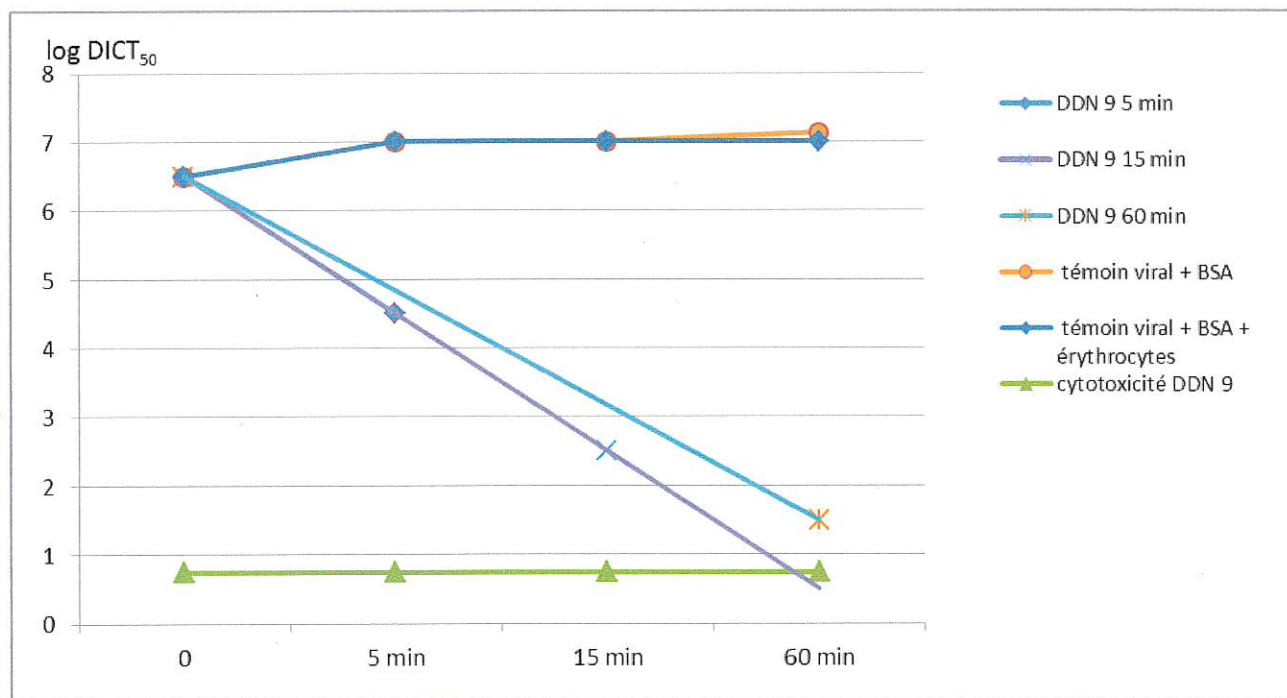
| Dilution (- log) | Résultat | % résultats positifs |
|-----------------------------------|----------|----------------------|
| -3 | 44444444 | 100 |
| -4 | 44444444 | 100 |
| -5 | 44444444 | 100 |
| -6 | 11111111 | 100 |
| -7 | 00000000 | 0 |
| -8 | 00000000 | 0 |
| -9 | 00000000 | 0 |
| -10 | 00000000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

Figure 1 – représentations graphiques des résultats des essais :

Essai 1



Essai 2



F2V1-EN14476-HIV-07-2017

Tableau A2 — Tableau des résultats du produit DDN 9 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 9 essai 1 | 0,5% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 0,875 | 6,5 | 4,5 | 2,375 | N.T. | 1,375 | R 15 min = 4,125 |
| DDN 9 essai 2 | 0,5% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 0,75 | 6,5 | 4,5 | 2,25 | N.T. | 1,375 | R 15 min = 4,25 |
| 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 9 | 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 9 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 9 essai 1 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 15 min | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4440 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | contrôle viral | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | |
| | | 3 g/l BSA | 15 min | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| contrôle viral | 15 min | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | | | |
| | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | | | |
| DDN 9 essai 1 cytotoxicité | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | N.A. | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| contrôle viral d'infectivité | N.A. | PBS | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 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% | | 5 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 1111 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | 15 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | 30 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| Formaldéhyde (cytotoxicité) | 0,70% | | N.A. | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | |
| | | | | 4444 | 1100 | 0000 | 0000 | | | | | |

Essai 2

| | Concentration | substance interférente | temps de contact | Dilutions | | | | | | | | |
|------------------------------|---------------|-------------------------------|------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | |
| DDN 9 essai 2 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 15 min | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | contrôle viral | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | |
| | | 3 g/l BSA | 15 min | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| contrôle viral | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | | | |
| | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | | | |
| DDN 9 essai 2 cytotoxicité | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | N.A. | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| contrôle viral d'infectivité | N.A. | PBS | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | |
| | N.A. | 3 g/l BSA | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | |
| | N.A. | 3 g/l BSA + 3 ml 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 9 | 0,5% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 5 min | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | 60 min | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4044 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |

| | Concentration | substance interférente | temps de contact | Log U | | Réduction | |
|-------|---------------|----------------------------------|------------------|-------|-------|-----------|----------|
| | | | | 0 | 5 min | | |
| DDN 9 | 0,5% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 5 min | 6,5 | 4,5 | 2 | inactive |
| | | | 60 min | 6,5 | 1,375 | 5,125 | active |

Sensibilité des cellules au virus :

| Produit | dilution | substance interférente | | Dilutions | | | | | | |
|---------|------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------|------|------|-------|------|------|------|
| | | | | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 |
| DDN 9 | 10 ⁻¹ | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | Cellules non traitées | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1111 | 0000 | 0000 |
| | | | Cellules traitées | 4444 | 4444 | 4444 | 4 444 | 1111 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 1000 | 0000 | 0000 |

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE DU
PRODUIT F010449V1 SELON LA NORME EN 14476**

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du : 08/10/2019

Références du dossier d'analyses : n°233D33-2019-13

TESTS VIRUCIDES :

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

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



Ce rapport inclus 12 pages.

Date d'édition : 16/12/2019

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



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



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

SOMMAIRE

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

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

1. LABORATOIRE AYANT REALISE LES ESSAIS

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

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

| Référence | Lot N° |
|-----------|--------|
| F010449V1 | 5767 |

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 : 17/10/2019

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

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Température d'essai : 20°C ± 1°C
- Méthode de titrage : log DICT₅₀
- Temps de contact : 1 min – 5 min – 15 min
- Concentrations finales : 0.50%
- Diluant du produit utilisé lors des essais : eau dure
- Souche virale : herpes virus type 1(ATCC ref. VR-260), cultivé sur cellules VERO, à 37°C, sous atmosphère à 5% CO₂
- Substances interférentes : 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton
- Stabilité du produit en présence de substance interférente : bonne
- Technique d'arrêt de l'action virucide : à froid

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

4. TITRE VIRAL

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

5. VALIDATION

a) Cytotoxicité

Le produit F010449V1 a été testé sur des cultures de cellules VERO et une faible toxicité a été observée jusqu'à la dilution 10⁻¹

b) Sensibilité des cellules aux virus

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

| Dilution du produit | Titre de virus (log DICT ₅₀) | | |
|----------------------------|---|---|---|
| | Suspension virale sur cellules non traitées | Suspension virale sur cellules traitées | Différence de titre viral (log DICT ₅₀) |
| F010449V1 10 ⁻² | 7,000 | 6,625 | 0,375 |

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

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



| Concentration | Substance interférente | Titre de virus (log DICT ₅₀) | Différence avec la suspension virale d'essai |
|----------------|---|--|--|
| F010449V1 0.5% | 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton | ESSAI 1: 7,000 | 0,00 |
| | | ESSAI 2: 7,000 | 0,00 |

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

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

| | Titre viral (log DICT ₅₀) | Réduction du titre viral (log DICT ₅₀) |
|---------------------------------|---------------------------------------|--|
| Suspension virale témoin | 7,000 | |
| Essai d'inactivation 5 min | 6,625 | 0,375 |
| Essai d'inactivation 15 min | 6,000 | 1,000 |
| Essai d'inactivation 30 min | 5,500 | 1,500 |

La validation des essais est effective si la réduction du titre viral entre la suspension témoin et la suspension soumise au formaldéhyde est comprise entre -0,5 et -2,5 log après 30 min. La réduction est de 1,500 log après 30 min et les conditions de la norme sont donc remplies.

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

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

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

| PRODUIT | Concentration (v/v) | Temps de contact | Température | Titre viral (log DICT ₅₀) | Réduction du titre viral |
|-----------|---------------------|------------------|-------------|---------------------------------------|--------------------------|
| F010449V1 | 0,5% | 1 min | 20°C | 3,500 | 3,500 |
| | | 5 min | | 2,875 | 4,125 |
| | | 15 min | | 2,500 | 4,500 |

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

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



| PRODUIT | Concentration (v/v) | Temps de contact | Température | Titre viral (log DICT ₅₀) | Réduction du titre viral |
|-----------|---------------------|------------------|-------------|---------------------------------------|--------------------------|
| F010449V1 | 0,5% | 1 min | 20°C | 3,625 | 3,375 |
| | | 5 min | | 2,750 | 4,250 |
| | | 15 min | | 2,375 | 4,625 |

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

7. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE

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

- Le titre de la suspension virale d'essai est suffisamment important pour permettre une observation de réduction de 4 log après essais; il est de 7,000 log DICT₅₀ pour l’herpès virus
- La différence des titres entre témoin viral et virus de référence dans l'essai d'inactivation est comprise entre -0.5 et -2.5 après 30 min; la différence est de 1,500 log après 30 min d’inactivation par le formaldéhyde pour l’herpès virus.
- Le produit testé n’affecte pas significativement la morphologie des cellules.
- Les conditions d’essai en conditions de saleté n’affectent pas l’infectivité du virus
- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité des cellules :
 - les titres de virus mis en contact avec les cellules traitées avec le produit et les cellules non traitées ont une différence inférieure à 1,0 log (la différence est de 0,375 log).

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

8. CONCLUSION

Les essais réalisés sur le produit F010449V1 ont démontré :

- Que le produit **F010449V1** employé à 0,5% finaux a une activité virucide sur l'herpès virus selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A2, pour 5 min de contact à 20°C, en conditions de saleté.



9. ANNEXE TECHNIQUE 1

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

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

Tampons et milieux de culture:

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

Réactifs:

- Sérum albumine bovine en poudre, Sigma Aldrich, réf. 05479, lot n° STBB7838V

Solution d'inactivation :

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





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

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

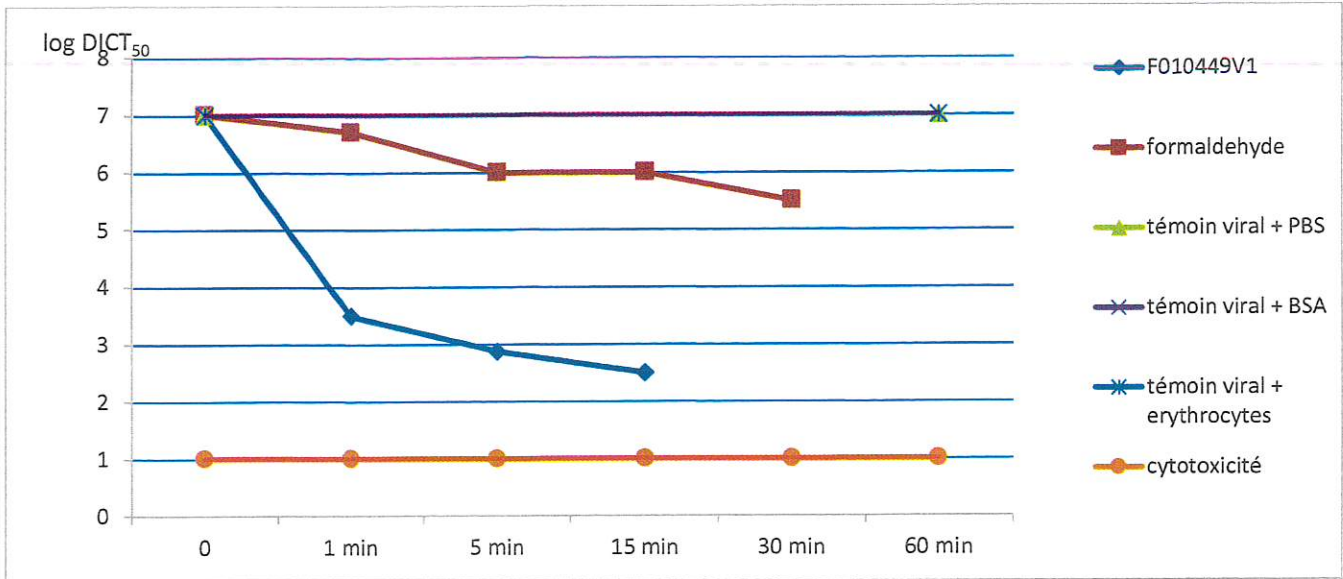
Log TCID₅₀ = 7,000

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

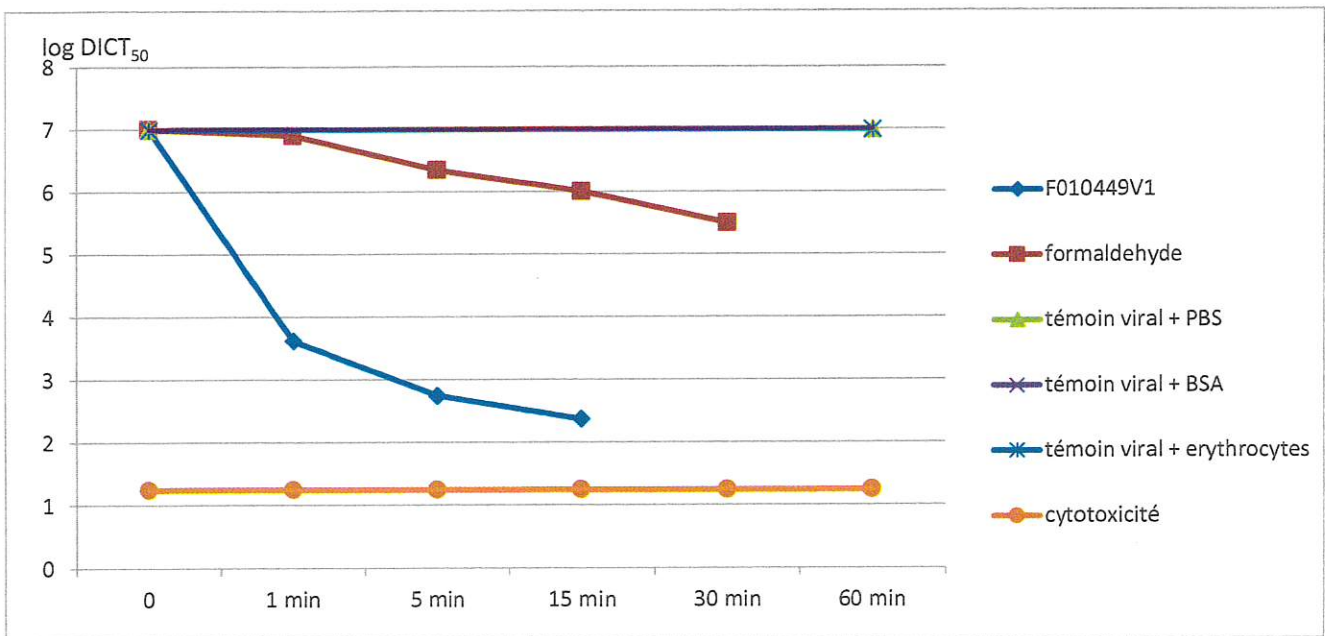
| Editor | Supervisor |
|---|---|
| Ms Emilie CANTREL, laboratory technician | Mrs Stephanie MOROT-BIZOT, Director |
|  |  |

Graphique

ESSAI 1



ESSAI 2





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

Tableau A2 — Tableau de résultats du produit F010449V1 soumis à essai contre l'herpès virus en conditions de saleté

| Produit | Concentration | Substance interférente | Niveau de cytotoxicité | Lg DICT ₅₀ | | | | | | Réduction |
|---|------------------|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------------------|
| | | | | 0 | 1 min | 5 min | 15 min | 30 min | 60 min | |
| F010449V1 essai 1 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml/l érythrocytes | 1,000 | 7,000 | 3,500 | 2,875 | 2,500 | N.T. | N.T. | 5 min R = 4,125 |
| F010449V1 essai 2 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml/l érythrocytes | 1,250 | 7,000 | 3,625 | 2,750 | 2,375 | N.T. | N.T. | 5 min R = 4,250 |
| Formaldéhyde Essai 1 | 0,70% | PBS | 2,000 | 7,000 | N.T. | 6,625 | 6,000 | 5,500 | N.T. | |
| Formaldéhyde Essai 2 | 0,70% | PBS | 2,250 | 7,000 | N.T. | 6,500 | 6,000 | 5,500 | N.T. | |
| Témoin infectivité Essai 1 | N.A. | PBS | N.A. | 7,000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | 7,000 | |
| Témoin infectivité Essai 1 | N.A. | 3 g/l BSA | N.A. | 7,000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | 7,000 | |
| Témoin infectivité Essai 1 | N.A. | 3 g/l BSA + 3 ml/l érythrocytes | N.A. | 7,000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | 7,000 | |
| Témoin infectivité Essai 2 | N.A. | PBS | N.A. | 7,000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | 7,000 | |
| Témoin infectivité Essai 2 | N.A. | 3 g/l BSA | N.A. | 7,000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | 7,000 | |
| Témoin infectivité Essai 2 | N.A. | 3 g/l BSA + 3 ml/l érythrocytes | N.A. | 7,000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | 7,000 | |
| Sensibilité des cellules au virus | 10 ⁻² | N.A. | Cellules non traitées | 7,000 | | | | | | |
| | | N.A. | Cellules traitées | 6,625 | | | | | | |



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

Tableau A3 — Résultats bruts ESSAI 1

| | Concentration | Substance interférente | Temps de contact | Dilutions | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---------------|-------------------------------|------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | -9 | |
| F010449V1 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 1 min | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | 5 min | 4444 | 4444 | 4440 | 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 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | | | |
| Témoin viral | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| F010449V1 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | N.A. | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| Formaldéhyde | 0,70% | PBS | 5 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | 15 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | 30 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| Formaldéhyde (cytotoxicité) | 0,70% | PBS | N.A. | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | |
| | | | | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | |
| Témoin viral infectivité | N.A. | PBS | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| Témoin viral infectivité | N.A. | 3 g/l BSA | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| Témoin viral infectivité | N.A. | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |



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

Tableau A4 — Résultats bruts ESSAI 2

| | Concentration | Substance interférente | Temps de contact | Dilutions | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---------------|-------------------------------|------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | -9 | |
| F010449V1 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 1 min | 4444 | 4444 | 4444 | 4000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | 5 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 | 4440 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | Témoin viral | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |
| F010449V1 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | N.A. | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| Formaldéhyde | 0,70% | PBS | 5 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | 15 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | 30 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| Formaldéhyde (cytotoxicité) | 0,70% | PBS | N.A. | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | |
| | | | | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | |
| Témoin viral infectivité | N.A. | PBS | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| Témoin viral infectivité | N.A. | 3 g/l BSA | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| Témoin viral infectivité | N.A. | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |





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

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

| Produit | Dilution | Substance interférente | | Dilutions | | | | | | | | |
|-----------|------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | | | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | -9 | |
| F010449V1 | 10 ⁻² | 3 g/l BSA + 3 ml érythrocytes | Cellules non traitées | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 |
| | | | Cellules traitées | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4000 | 1000 | 0000 | 0000 |
| | | | Cellules traitées | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |

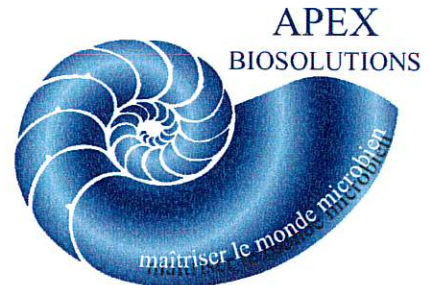
| Editor | Supervisor |
|---|---|
| Ms Emilie CANTREL, laboratory technician | Mrs Stephanie MOROT-BIZOT, Director |
|  |  |

RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE DU PRODUIT
F010449V1 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°090D27-2020-04

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

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

1. LABORATOIRE AYANT REALISE LES ESSAIS

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

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

| ECHANTILLON | LOT N° |
|-------------|--------|
| F010449V1 | 6485 |

Date limite d'utilisation optimale : non communiquée

Fabricant : FRANKLAB

Date de fabrication : non communiquée

Conditions de stockage : Température ambiante et obscurité.

Substances actives : ammonium quaternaire

Aspect : liquide incolore

Diluant préconisé par le fabricant : eau potable

Date de réception au laboratoire : 28/05/2020



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

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Température d'essai: 20°C ± 1°C
- Méthode de titrage: log DICT₅₀
- Temps de contact : 5 min, 10 min et 15 min
- Concentrations finales: 0,5%
- Diluant du produit utilisé lors des essais: eau dure
- Souche virale : *Vaccinia virus* ATCC VR-1508, cultivé sur cellules BHK-21, sous atmosphère à 5% CO₂
- Substances interférentes : 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton
- Stabilité du produit en présence de substance interférente : bonne
- Technique d'arrêt de l'action virucide : à froid

Titre viral :

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

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

4. VALIDATION DE LA METHODE

a) Cytotoxicité

Les cellules BHK-21 ont été exposées au produit F010449V1 et une faible toxicité a été observée jusqu'à la dilution 10^{-1}

b) Sensibilité des cellules aux virus

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

| VACCINIA VIRUS | | Titre de virus (log DICT ₅₀) | | |
|----------------|-----------|---|---|---|
| | | Suspension virale sur cellules non traitées | Suspension virale sur cellules traitées | Différence de titre viral (log DICT ₅₀) |
| F010449V1 | 10^{-2} | 6,250 | 5,750 | 0,500 |

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 ₅₀) | Différence avec la suspension virale d'essai |
|--------------------------|---|--|--|
| F010449V1 0,5% | 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton | Essai 1: 6,375 | 0,000 |
| | | Essai 2: 6,375 | 0,000 |

d) Essai d'inactivation de référence

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

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

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

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

Essai 1 – séchage 47 min

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

| PRODUIT | Concentration | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai (log DICT ₅₀) | Réduction du titre viral |
|------------------|---------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| F010449V1 | 0,5% | 15 min | 20°C | 1,750 | 4,375 |
| | | 10 min | | 2,250 | 3,875 |
| | | 5 min | | 3,125 | 3,000 |

Essai 2 – séchage 49 min

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



| PRODUIT | Concentration | Temps de contact | Température de contact | Titre après essai (log DICT ₅₀) | Réduction du titre viral |
|------------------|---------------|------------------|------------------------|---|--------------------------|
| F010449V1 | 0,5% | 15 min | 20°C | 2,000 | 4,250 |
| | | 10 min | | 2,500 | 3,750 |
| | | 5 min | | 3,125 | 3,125 |

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

6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE

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



- Le titre de la suspension virale d'essai est suffisamment important pour permettre une observation de réduction de 4 log après essais : il est de 6,375 log DICT₅₀ pour le virus de la vaccine.
- La différence des titres entre témoin viral et virus de référence dans l'essai d'inactivation est > 4 log : la différence est de 4,375 log après 5 min d'inactivation par le glutardialdéhyde pour le virus de la vaccine.
- Le produit testé n'affecte pas significativement la morphologie des cellules.
- Les conditions d'essai en saleté (3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton) n'affectent pas l'infectivité du virus de la vaccine.
- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité des cellules au virus de la vaccine. Les titres de virus mis en contact avec les cellules traitées avec le produit et les cellules non traitées ont une différence inférieure à 1,0 log (la différence est de 0,500 log).

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

7. CONCLUSION

Les essais réalisés sur le produit F010449V1 lot n°6485 ont démontré :

- Que le produit F010449V1, **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 15 minutes de contact à 20°C, en conditions de saleté.**

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

8. ANNEXE 1

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

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

Tampons et milieux de culture:

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



Réactifs:

- Sérum albumine bovine en poudre, Dominique DUTSCHER, réf. 871001, lot D1304039

Solution d'inactivation :

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

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

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

9. ANNEXE 2

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

Log DICT₅₀ = 6,375

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



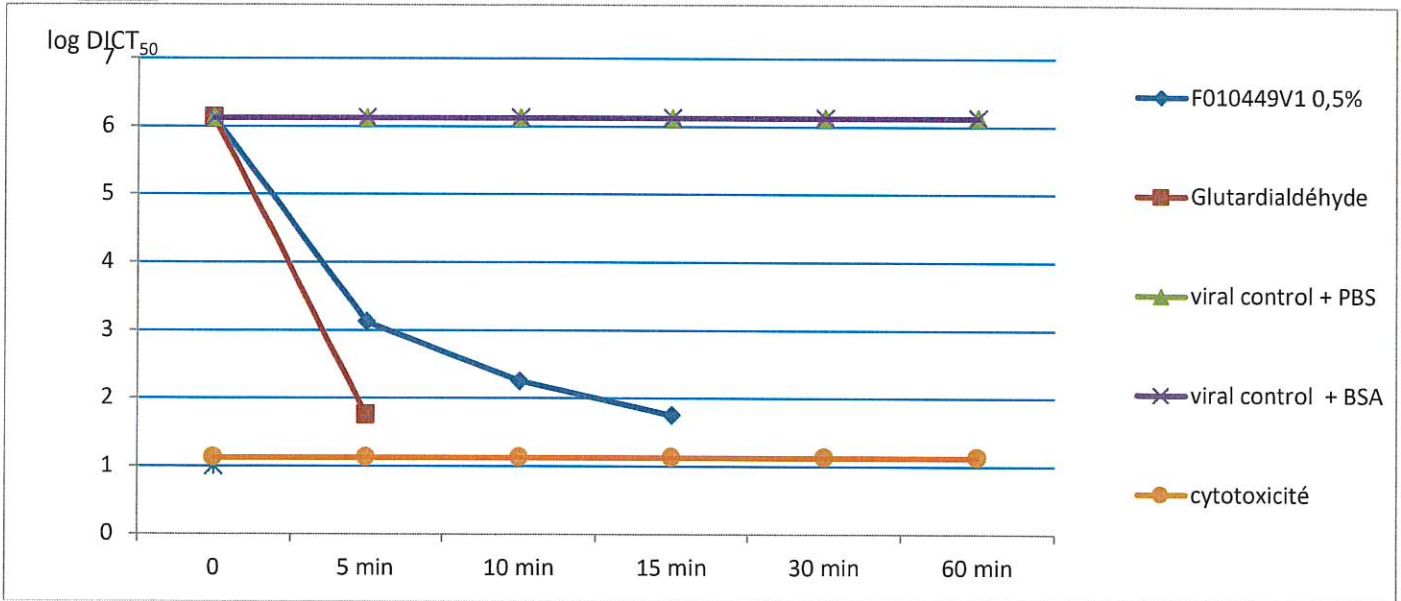
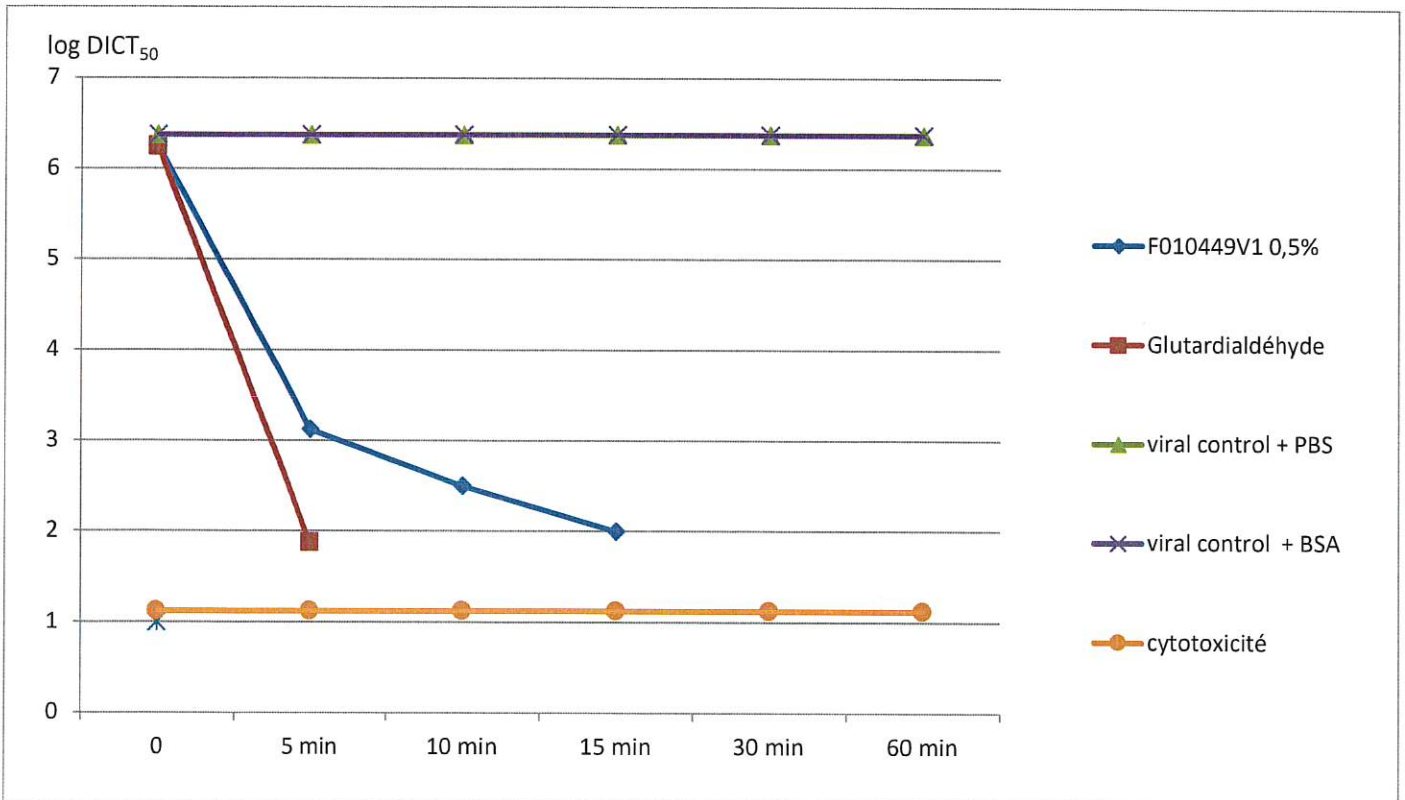
| Writer | Supervisor |
|---|---|
| Ms Emilie CANTREL, laboratory technician | Ms Stephanie MOROT-BIZOT, director |
|  |  |

Figure 1 – représentations graphiques des résultats des essais :

Essai 1



Essai 2





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

Tableau A2 — Tableau de résultats du produit F010449V1 soumis à essai contre le virus de la vaccine en conditions de saleté

| PRODUIT | Concentration | Substance interférente | Niveau de cytotoxicité | Lg TCID ₅₀ | | | | | | Réduction | |
|--|------------------|--|--------------------------|-----------------------|-------|--------|--------|--------|--------|---------------------|--|
| | | | | 0 | 5 min | 10 min | 15 min | 30 min | 60 min | | |
| F010449V1 ESSAI 1 | 0,50% | 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton | 1,125 | 6,125 | 3,125 | 2,250 | 1,750 | N.T. | N.T. | 15 min R = 4,375 | |
| F010449V1 ESSAI 2 | 0,50% | 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton | 1,125 | 6,250 | 3,125 | 2,500 | 2,000 | N.T. | N.T. | 15 min R = 4,250 | |
| Glutardialdéhyde ESSAI 1 | 100 ppm | PBS | 1,875 | 6,125 | 1,750 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | | |
| Glutardialdéhyde ESSAI 2 | 100 ppm | PBS | 2,000 | 6,250 | 1,875 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | | |
| Contrôle viral d'infectivité ESSAI 1 | N.A. | PBS | N.A. | 6,125 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | 6,125 | | |
| Contrôle viral d'infectivité ESSAI 1 | N.A. | 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton | N.A. | 6,125 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | 6,125 | | |
| Contrôle viral d'infectivité ESSAI 2 | N.A. | PBS | N.A. | 6,375 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | 6,375 | | |
| Contrôle viral d'infectivité ESSAI 2 | N.A. | 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton | N.A. | 6,375 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | 6,375 | | |
| Sensibilité des cellules au virus | 10 ⁻² | N.A. | Cellules non traitées | 6,250 | | | | | | | |
| | | N.A. | Cellules traitées | 5,750 | | | | | | | |





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

Tableau A3 — Données brutes du produit F010449V1 soumis à essai contre le virus de la vaccine, en conditions de saleté (titrage par effet cytopathique; 8 puits).

ESSAI

| | Concentration | Substance interférente | Temps de contact | Dilutions | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|---------------|--|------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | -9 | | |
| F010449V1 ESSAI 1 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton | 15 min | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | 10 min | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| 5 min | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| | 4444 | 4444 | 4000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| Témoin eau | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| F010449V1 cytotoxicité | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton | N.A. | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| Glutardialdéhyde | 100 ppm | PBS | 5 | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| Glutardialdéhyde (cytotoxicité) | 100 ppm | PBS | N.A. | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | |
| | | | | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | | |
| Contrôle viral d'infectivité | N.A. | 3 g/L BSA | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4000 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4000 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| Contrôle viral d'infectivité | N.A. | 3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4000 | 0000 | 0000 | 0000 | | |
| | | | 60 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4000 | 0000 | 0000 | 0000 | | |



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

ESSAI 2

| | Concentration | Substance interférente | Temps de contact | Dilutions | | | | | | | | | |
|------------------------------------|---------------|--|------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | | | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | -9 | |
| F010449V1 ESSAI 2 | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton | 15 min | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | 10 min | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | 4444 | | | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| 5 min | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | | | |
| | 4444 | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | | | |
| Témoin eau | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| F010449V1 cytotoxicité | 0,50% | 3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton | N.A. | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4000 | 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 | |
| Glutardialdéhyde (cytotoxicité) | 100 ppm | PBS | N.A. | 4444 | 4440 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | |
| | | | | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | N.T. | |
| Contrôle viral d'infectivité | N.A. | 3 g/L BSA | 0 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 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 d'infectivité | N.A. | 3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes 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 | |
| F010449V1 | 10 ⁻² | 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton | Cellules non traitées | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | Cellules traitées | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 4400 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| | | | | 4444 | 4444 | 4444 | 4444 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |

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