

RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE FONGICIDE DU
PRODUIT F1031V2 SELON LA NORME EN 13624**

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du : 13/03/2019

Références du dossier d'analyses : n°072D08-2019-06

ESSAI DE FONGICIDIE :

Selon la méthodologie de la norme européenne NF EN 13624 (Novembre 2013) – antiseptiques et désinfectants chimiques – essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide des désinfectants utilisés pour les instruments en médecine.

Essai sur une souche : *Aspergillus brasiliensis*.

Ce rapport comporte 8 pages et ne concerne que les échantillons étudiés.

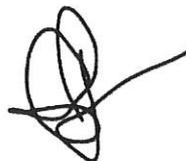
Date d'émission : 10/04/2019

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

Professeur Georges HERBEIN
Professeur des Universités Praticien Hospitalier
Expert scientifique



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



SOMMAIRE

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS 3

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS 3

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES 3

4. RESULTATS PROPRESMENT DITS..... 4

5. CONCLUSION 4

6. FEUILLES DE RESULTATS 4

7. *Aspergillus brasiliensis* - ESSAI 4

8. *Aspergillus brasiliensis* - REPETITION..... 6

9. ANNEXE TECHNIQUE 8

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

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS

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

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

Echantillon	N° lot
F1031V2	611141B01

Date limite d'utilisation optimale : non communiquée

Fabricant : FRANKLAB

Date de fabrication : non communiquée

Conditions de stockage : Température ambiante et obscurité.

Composants actifs : éthanol, isopropanol et amine tertiaire

Aspect : liquide transparent

Précautions d'emploi : aucune

Diluant préconisé par le fabricant : eau potable

Date de réception au laboratoire : 14/03/2019

Période de l'étude : du 27/03/2019 au 03/04/2019

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Concentration du produit soumis à l'essai : 100% (80% finaux).
- Méthode employée : EN 13624
- Temps de contact : 5 min – 10 min – 15 min
- Température d'essai : 20°C
- Substance interférente : albumine bovine (3g/L) et érythrocytes de mouton (3 mL/L), conditions de saleté.
- Diluant des suspensions levuriennes et des essais : solution tryptone sel stérile pour les dénombrements et neutralisant pour les essais.
- Souches utilisées : *Aspergillus brasiliensis* CIP 1431.83 lot 252.09- Institut Pasteur.
- Technique d'arrêt de l'action fongicide : transfert du porte germe dans 10 ml de neutralisant à base de polysorbate 80 (30g/l) et de jaune d'œuf (5%) dans de l'eau distillée.

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

4. RESULTATS PROPUREMENT DITS

Le produit F1031V2 est bien actif vis-à-vis des souches de référence utilisées, car la réduction obtenue est supérieure à 4 log :

Voir feuilles de résultats.

- actif sur *Aspergillus brasiliensis* dès 10 min de contact car $R = 4,02 \log$

5. CONCLUSION

Conformément à la norme EN 13624 (Novembre 2013), le produit F1031V2, lot n° 611141B01 :

- a une activité fongicide sur la souche *Aspergillus brasiliensis* lorsqu'employé pur, pour 10 min de contact à 20°C, en conditions de saleté (albumine bovine à 3g/L et érythrocytes de mouton à 3 mL/L).

6. FEUILLES DE RESULTATS

Voir ci-après.

7. *Aspergillus brasiliensis* - ESSAI

Vérifications de la méthodologie:

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

Légende :

Vc = dénombrement par ml

\bar{x} = moyenne de Vc1 et Vc2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Norme: EN 13624 Produit : F1031V2 Lot N° : 611141B01 Etude N° : 072D08-2019-06 Date des essais : 29/03/2019	Méthode: <input checked="" type="checkbox"/> Ensemencement dans la masse <input type="checkbox"/> Ensemencement en surface <input checked="" type="checkbox"/> Nombre de boîtes de Pétri/mL : 1	Neutralisant : polysorbate 80 (30g/L) + jaune d'œuf 5% Température des essais : 20°C Substance interférente : 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton Température d'incubation : 30°C ± 1°C Diluant : eau distillée stérile
--	--	---

Micro-organisme d'essai	Suspension de validation Nv		Suspension de validation NvB		Validation A		Validation B		Validation C	
	66	63	43	51	42	44	50	50	48	39
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	\bar{X}	64,5	\bar{X}	4,70.10 ⁴	\bar{X}	43,0	\bar{X}	50,0	\bar{X}	43,5
	30 ≤ Nv ≤ 160		3.10 ³ ≤ NvB ≤ 1.6.10 ⁵		A ≥ 0,5 * Nv0		B ≥ 0,5 * Nv0		C ≥ 0,5 * Nv0	
	x oui <input type="checkbox"/> non		x oui <input type="checkbox"/> non		x oui <input type="checkbox"/> non		x oui <input type="checkbox"/> non		x oui <input type="checkbox"/> non	

Micro-organisme d'essai	Suspension d'essai		Essai 5 min		Essai 10 min		Essai 15 min	
	1.10 ⁻⁵	>165	Vc	121	Vc	18	Vc	2
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1.10 ⁻⁶	41	Na	1270,00	Na	185,00	Na	<140
	N	1,88.10 ⁷	Log Na	3,10	Log Na	2,27	Log Na	<2,15
	Log NO	6,27	Log R = logNO-logNa	3,17	Log R = logNO-logNa	4,00	Log R = logNO-logNa	>4,12

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

8. *Aspergillus brasiliensis* - REPETITIONVérifications de la méthodologie:

- N est compris entre $1,5 \times 10^7$ UFC/ml et $5,0 \times 10^7$ UFC/ml
- Nv0 est compris entre 30 et 160 UFC/ml
- A, B et C sont égaux ou supérieurs à $0,5 \times Nv0$
- Le quotient des dénombrements moyens pondérés est compris entre 5 et 15

Légende :

Vc = dénombrement par ml

\bar{x} = moyenne de Vc1 et Vc2

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

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

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

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

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

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

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

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

<p>Norme: EN 13624 Produit : F1031V2 Lot N° : 611141B01 Etude N° : 072D08-2019-06 Date des essais : 03/04/2019</p>	<p>Méthode:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Ensemencement dans la masse <input type="checkbox"/> Ensemencement en surface <input checked="" type="checkbox"/> Nombre de boîtes de Pétri/mL : 1</p>
<p>Neutralisant : polysorbate 80 (30g/L) + jaune d'œuf 5% Température des essais : 20°C Substance interférente : 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton Température d'incubation : 30°C ± 1°C Diluant : eau distillée stérile</p>	

Micro-organisme d'essai	Suspension de validation Nv		Suspension de validation NvB		Validation A		Validation B		Validation C		
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	59	61	1.10 ⁻³	52	47	49	50	55	51	47
\bar{X}		60,0	\bar{X}	4,95.10 ⁴		\bar{X}	49,5	\bar{X}	53,0	\bar{X}	47,0
30 ≤ Nv0 ≤ 160 x oui <input type="checkbox"/> non		3,10 ³ ≤ NvB ≤ 1,6.10 ⁵ x oui <input type="checkbox"/> non		A ≥ 0,5 * Nv0 x oui <input type="checkbox"/> non		B ≥ 0,5 * Nv0 x oui <input type="checkbox"/> non		C ≥ 0,5 * Nv0 x oui <input type="checkbox"/> non			

Micro-organisme d'essai	Suspension d'essai		Essai		Essai		Essai		Essai		
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1.10 ⁻⁵	>165	Vc	135	149	Vc	20	16	Vc	3
1.10 ⁻⁶		53	Na	1420,00		Na	180,00		Na	<140	
N		1,97.10 ⁷	Log Na	3,15		Log Na	2,26		Log Na	<2,15	
Log NO		6,29	Log R = logNO-logNa	3,14		Log R = logNO-logNa	4,03		Log R = logNO-logNa	>4,14	

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

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

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

SUBSTANCES INTERFÉRENTES :

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

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

DILUANT Solution Tryptone-Sel (TS)

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

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

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

NEUTRALISANT

Ingrédients par litre d'eau distillée:

Polysorbate 80, SIGMA ALDRICH, réf. 59924, lot n° BCBJ6978V ----- 30 g
Jaune d'œuf frais ----- 50 ml

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

EAU DURE

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

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

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

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

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

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

RAPPORT D'ESSAI

DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE DU PRODUIT F1031V2 SELON LA NORME EN 14476

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du: 18/10/2018

Références du dossier d'analyses: n°268D25-2018-09

ESSAIS DE VIRUCIDIE:

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

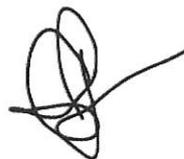
Essais sur 1 souche de référence: *norovirus murin*.

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

Date d'émission : 14/12/2018

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

Professeur Georges HERBEIN
Professeur des Universités Praticien Hospitalier
Expert scientifique



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

SOMMAIRE

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS3

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS3

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES3

4. VALIDATION DE LA METHODE4

5. ESSAIS PROPREMENT DITS – CALCUL DE L’ACTIVITE VIRUCIDE5

6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE6

7. CONCLUSION6

8. ANNEXE 17

9. ANNEXE 28

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

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES ESSAIS

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

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

Echantillon	N° lot
F1031V2	611141

- Date limite d'utilisation optimale : non communiquée
- Fabricant : FRANKLAB
- Date de fabrication : non communiquée
- Conditions de stockage : Température ambiante et obscurité.
- Composants actifs : éthanol, isopropanol, amine tertiaire
- Aspect : liquide incolore
- Précautions d'emploi : aucune
- Diluant préconisé par le fabricant : aucun, produit prêt-à-l'emploi
- Date de réception au laboratoire : 24/10/2018
- Période de l'étude : du 02/11/2018 au 05/12/2018

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Température d'essai: 20°C ± 1°C
- Méthode de titrage: virus titré en log DICT₅₀
- Temps de contact: 30 s, 2 min et 5 min
- Concentration cible: produit pur
- Diluant du produit utilisé lors des essais: eau distillée
- Souche de virus testée: norovirus murin MNV-1 (IFL), cultivé sur cellules RAW 264.7, 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

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

Titre viral :

Titration par effet cytopathique de la suspension virale d'essai du norovirus (calculé selon la méthode de Spearman-Kärber) = 7,125 log DICT₅₀.

4. VALIDATION DE LA METHODE

a) Méthodologie

Le produit F1031V2 a été testé sur des cultures de cellules RAW et une légère cytotoxicité a été observée (jusqu'à la dilution 10⁻¹).

b) Sensibilité des cellules aux virus

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

Dilution produit		Titre de virus (log DICT ₅₀)		
		Suspension virale sur cellules non traitées	Suspension virale sur cellules traitées	Différence de titre viral (log DICT ₅₀)
F1031V2	10 ⁻²	7,125	6,750	0,375

La différence de titre viral doit être inférieure à 1,0 log. Le produit F1031V2 testé à la concentration indiquée ci-dessus ne montre pas d'influence sur la méthode de titrage du norovirus.

c) Validations de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit F1031V2 :

Concentration du produit	Substances interférentes	Titre de virus (log DICT ₅₀)	Différence avec la suspension virale d'essai
F1031V2 100 %	3 g/L de sérum albumine bovine + 3 mL érythrocytes de mouton	Essai 1: 7,125	0,000
		Essai 2: 7,125	0,000

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

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

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	6,750	0,375
Essai d'inactivation 15 min	5,500	1,625
Essai d'inactivation 30 min	5,000	2,125

La validation des essais est effective si la réduction du titre viral entre la suspension témoin et la suspension soumise au formaldéhyde est comprise entre -0,5 et -2,5 log après 30 min. La réduction est de 2,125 log après 30 min et les conditions de la norme sont donc remplies.

5. ESSAIS PROPREMENT DITS – CALCUL DE L'ACTIVITE VIRUCIDE***Essai 1***

La suspension virale témoin a une concentration de 7,125 log DICT₅₀.

PRODUIT	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral
F1031V2	100%	30 s	20°C	4,000	3,125
		2 min		3,500	3,625
		5 min		3,000	4,125

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 7,125 log DICT₅₀.

PRODUIT	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral
F1031V2	100 %	30 s	20°C	3,750	3,375
		2 min		3,375	3,750
		5 min		2,875	4,250

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

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

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 7,125 log DICT₅₀ pour le norovirus.
- La différence des titres entre témoin viral et virus de référence dans l'essai d'inactivation est comprise entre -0.5 et -2.5 après 30 min; la différence est de 2,125 logs après 30 min d'inactivation par le formaldéhyde pour le norovirus.
- 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 norovirus. 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 F1031V2 est inférieure à 0,5 log (0,0 log DICT₅₀ essai 1 et 0,000 log DICT₅₀ essai 2)

7. CONCLUSION

Les essais réalisés sur le produit F1031V2 lot n° 611141 ont démontré:

- que le produit F1031V2 employé pur, a une activité virucide sur le norovirus selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A1, pour 5 minutes de contact à 20°C, en conditions de saleté.

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

8. ANNEXE 1

Lignée cellulaire utilisée : cellules RAW 264.7 (ATCC TIB-71)

Viral strain: norovirus murin, souche S99 (lot n° 4/200409/220409- Friedrich Loeffler Institut)

Tampons et milieux de culture:

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

Réactifs:

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

Solution d'inactivation:

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

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

RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE DU
PRODUIT F1031V2 lingettes SELON LA NORME EN 14476**

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du: 18/10/2018

Références du dossier d'analyses: n°268D25-2018-23

ESSAIS DE VIRUCIDIE:

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

Essais sur 1 souche de référence: *poliovirus*.

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

Date d'émission : 31/12/2018

Stéphanie MOROT-BIZOT

Docteur en microbiologie
Chargée de l'étude



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

SOMMAIRE

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS3

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS3

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES3

4. VALIDATION DE LA METHODE4

5. ESSAIS PROPREMENT DITS – CALCUL DE L’ACTIVITE VIRUCIDE5

6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE6

7. CONCLUSION6

8. ANNEXE 17

9. ANNEXE 28

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

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS

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

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

Echantillon	N° lot
F1031V2	701301

Date limite d'utilisation optimale : non communiquée

Fabricant : FRANKLAB

Date de fabrication : non communiquée

Conditions de stockage : Température ambiante et obscurité.

Composants actifs : éthanol, isopropanol, amine tertiaire

Aspect : lingettes non tissées, VH 23g/m², imprégnation 280%

Précautions d'emploi : aucune

Diluant préconisé par le fabricant : aucun, produit prêt-à-l'emploi

Date de réception au laboratoire : 09/11/2018

Période de l'étude : du 12/11/2018 au 30/12/2018

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

Température d'essai: 20°C ± 1°C

Méthode de titrage: virus titré en log DICT₅₀

Temps de contact: 5 min, 10 min et 30 min

Concentration du produit soumis à l'essai : produit pur. Extraction du produit par essorage manuel.

Diluant du produit utilisé lors des essais: eau distillée

Souche de virus testée: poliovirus type 1, souche LSc-2ab (IFL), cultivé sur cellules VERO, 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

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

Titre viral :

Titration par effet cytopathique de la suspension virale d'essai (calculé selon la méthode des plages de lyse) = 6,59 log UFP/mL.

4. VALIDATION DE LA METHODE**a) Méthodologie**

Le produit **F1031V2** a été testé sur des cultures de cellules VERO et une légère cytotoxicité a été observée (jusqu'à la dilution 10^{-1}).

b) Sensibilité des cellules aux virus

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

Dilution produit	Titre de virus (log UFP/mL)		
	Suspension virale sur cellules non traitées	Suspension virale sur cellules traitées	Différence de titre viral (log UFP/mL)
F1031V2 10^{-2}	6,60	6,42	0,18

La différence de titre viral doit être inférieure à 1,0 log. Le produit F1031V2 testé à la concentration indiquée ci-dessus ne montre pas d'influence sur la méthode de titrage du poliovirus.

c) Validations de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit F1031V2 :

Concentration du produit	Substances interférentes	Titre de virus (log UFP/mL)	Différence avec la suspension virale d'essai
F1031V2 100 %	3 g/L de sérum albumine bovine + 3 mL érythrocytes de mouton	Essai 1: 6,59	0,00
		Essai 2: 6,59	0,00

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

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

d) Essai d'inactivation de référence

	Titre de virus (log UFP/mL)	Réduction du titre viral (log UFP/mL)
Suspension virale témoin	6,59	
En formaldéhyde 0,7%		
Essai d'inactivation 5 min	6,51	0,08
Essai d'inactivation 15 min	5,56	1,03
Essai d'inactivation 30 min	4,48	2,11

La validation des essais est effective si la réduction du titre viral entre la suspension témoin et la suspension soumise au formaldéhyde est comprise entre -0,5 et -2,5 log après 30 min. La réduction est de 2,11 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 6,59 log UFP/mL.

PRODUIT	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log UFP/mL)	Réduction du titre viral
F1031V2	100%	5 min	20°C	2,88	3,71
		10 min		2,43	4,16
		30 min		1,96	4,63

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 6,59 log UFP/mL.

PRODUIT	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log UFP/mL)	Réduction du titre viral
F1031V2	100 %	5min	20°C	2,96	3,63
		10 min		2,39	4,20
		30 min		1,86	4,73

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

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

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 6,59 log UFP/mL pour le poliovirus.
- La différence des titres entre témoin viral et virus de référence dans l'essai d'inactivation est comprise entre -0.5 et -2.5 après 30 min; la différence est de 2,11 logs après 30 min d'inactivation par le formaldéhyde pour le poliovirus.
- Le produit testé n'affecte pas significativement la morphologie des cellules.
- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité des cellules au poliovirus. 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 0,18 log).

7. CONCLUSION

Les essais réalisés sur le produit lingettes F1031V2 lot n° 701301 ont démontré:

- que le produit **F1031V2** employé pur, a une activité virucide sur le poliovirus selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A1, pour 10 minutes de contact à 20°C, en conditions de saleté.

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

8. ANNEXE 1

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

Souche virale: poliovirus type 1, souche LSc-2ab (ref RVB-1260 - lot n° 2/10121998- Friedrich Loeffler Institut)

Tampons et milieux de culture:

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

Réactifs:

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

Solution d'inactivation:

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

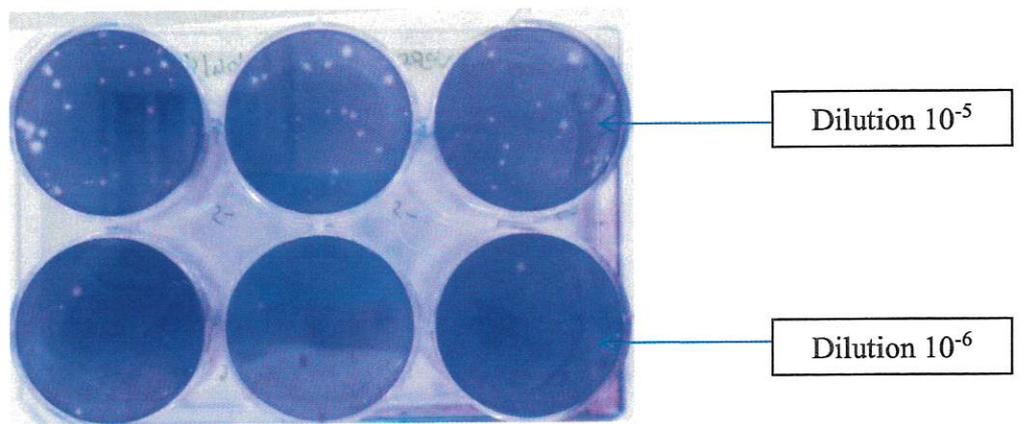
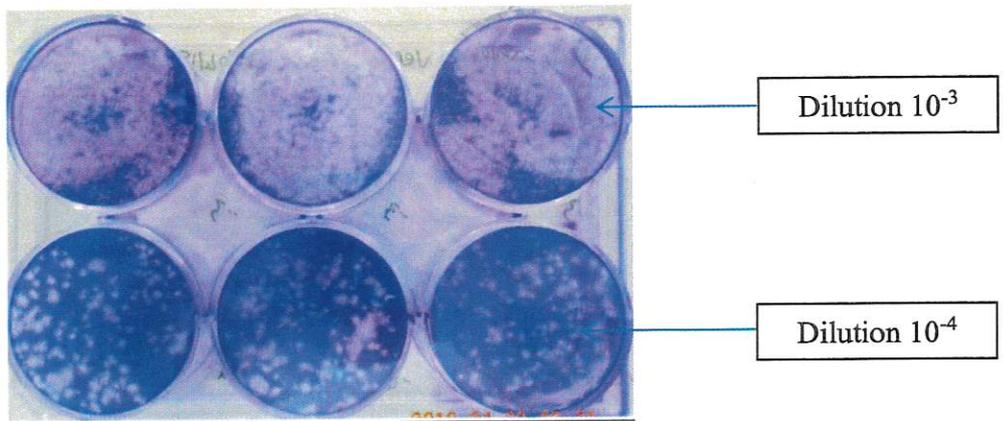
Rédacteur	Superviseur
Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire	Mme Stephanie MOROT-BIZOT, directrice
	

9. ANNEXE 2

Tableau A3 - Titrage du poliovirus par effet cytopathique, par la méthode des plages de lyse :

Dilution (- log)	PUIT 1	PUIT 2	PUIT 3	
-4	385,00	385,00	398,00	1168,00
-5	43,00	39,00	34,00	116,00
-6	4,00	5,00	3,00	12,00
TOTAL PLAGES DE LYSÉ				1296,00

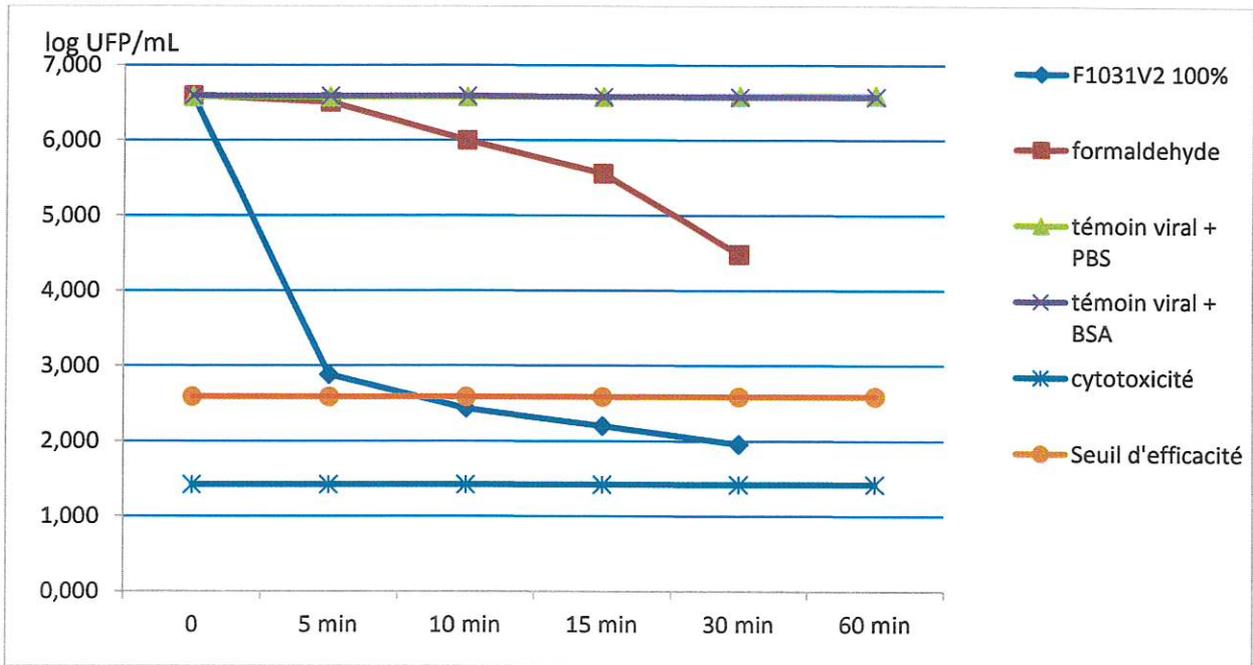
log UFP/mL = 6,59



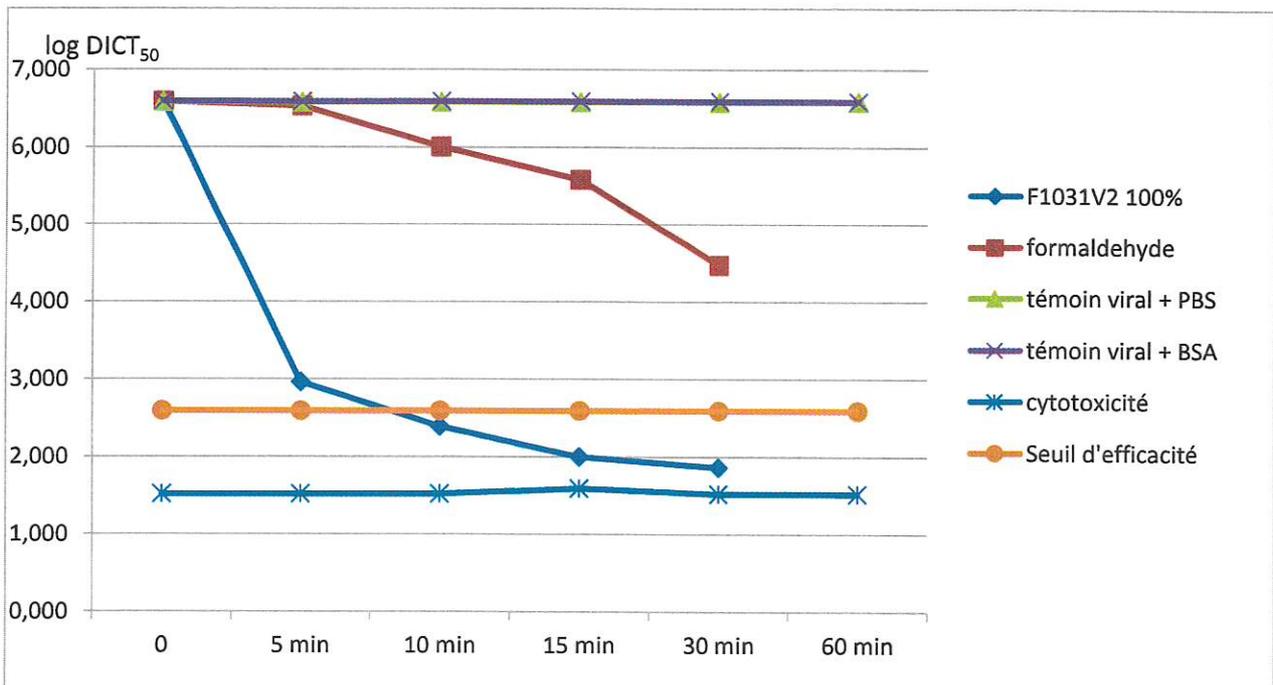
Rédacteur	Superviseur
Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire	Mme Stephanie MOROT-BIZOT, directrice

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

Essai 1



Essai 2



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

Tableau A8 — Tableau des résultats du produit F1031V2 sur le poliovirus dans des conditions de saleté

Produit	Concentration	Substance interférente	Niveau de cytotoxicité	Lg UFP/mL						Réduction
				0	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	
F1031V2 essai 1	100,00%	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	1,42	6,59	2,88	2,43	N.T.	1,96	N.T.	10 min R = 4,16
F1031V2 essai 2	100,00%	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	1,52	6,59	2,96	2,39	N.T.	1,86	N.T.	10 min R = 4,20
Formaldéhyde Essai 1	0,70%		0,36	6,59	6,51	N.T.	5,56	4,48	N.T.	
Formaldéhyde Essai 2	0,70%		0,34	6,59	6,53	N.T.	5,58	4,47	N.T.	
Témoin infectivité Essai 1	N.A.	PBS	N.A.	6,58	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,59	
Témoin infectivité Essai 1	N.A.	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	N.A.	6,59	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,57	
Témoin infectivité Essai 2	N.A.	PBS	N.A.	6,59	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,59	
Témoin infectivité Essai 2	N.A.	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	N.A.	6,59	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,59	
Sensibilité des cellules au virus	10 ⁻²	N.A.	Cellules non traitées	6,60						
		N.A.	Cellules traitées	6,42						

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

Tableau A9 — Données brutes pour le produit F1031V2 soumis à essai contre le poliovirus (titrage par effet cytopathique ; 8 puits)

Essai 1

	Concentration	Substance interférente	Temps de contact	Dilutions					
				-1	-2	-3	-4	-5	-6
F1031V2 essai 1	100,00%	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	5 min	85	8	1			
				77	6	0			
				69	7	0			
			10 min	24	3	0			
				30	2	0			
30 min	26	4	0						
	12	1	0						
			8	0	0				
			9	0	0				
			contrôle viral	6,59					
F1031V2 essai 1 cytotoxicité	100,00%	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	N.A.	25	2				
				28	0				
				24	0				
Formaldéhyde	0,70%		5				301	30	4
							332	28	2
							341	34	4
			15			359	44	4	0
						360	42	8	0
						347	35	4	1
			30			285	33	3	0
						274	29	4	0
						269	29	3	0
Formaldéhyde (cytotoxicité)	0,70%		N.A.	22	2				
				22	0				
				26	3				
Témoin viral infectivité	N.A.	PBS	0				370	38	4
							375	41	5
							379	39	4
			60			379	43	6	
						388	45	4	
						395	40	4	
Témoin viral infectivité	N.A.	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	0				395	44	5
							384	40	4
							389	39	5
			60			390	38	7	
						346	38	4	
						376	43	4	

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

Essai 2

	Concentration	Substance interférente	Temps de contact	Dilutions					
				-1	-2	-3	-4	-5	-6
F1031V2 essai 2	100,00%	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	5 min	90	10	1			
				94	10	1			
				86	9	2			
			10 min	25	4	0			
				21	2	0			
30 min	26	3	0						
contrôle viral	6,59								
F1031V2 essai 2 essai 2 cytotoxicité	100,00%	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	N.A.	30	2				
				28	3				
				33	3				
Formaldéhyde	0,70%		5				325	34	5
							344	38	4
							337	39	4
			15			380	39	4	0
						376	42	5	0
						371	39	4	0
30			301	30	3	0			
			296	31	2	0			
			279	30	3	0			
Formaldéhyde (cytotoxicité)	0,70%		N.A.	20	2				
				20	2				
				26	3				
Témoin viral infectivité	N.A.	PBS	0				385	38	4
							381	41	5
							390	39	4
			60			378	40	4	
		389		39	4				
		389		41	6				
Témoin viral infectivité	N.A.	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	0				401	40	4
							395	42	5
							378	39	4
			60			392	39	4	
						393	41	7	
			379	44	5				
Rédacteur			Superviseur						
Mme Emilie CANTREL, technicienne de laboratoire			Mme Stéphanie MOROT-BIZOT, directrice						
									

Sensibilité des cellules au poliovirus:

Produit	dilution	Substance interférente		Dilutions						Total plages	Log	R
				-1	-2	-3	-4	-5	-6			
F1031V2	10 ⁻¹	3 g/l BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton	Cellules non traitées				390	40	4			
							395	42	4	1324	6,60	
							399	45	5			0,18
			Cellules traitées			259	26	3				
						249	25	3	879	6,42		
						282	29	3				

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



RAPPORT D'ESSAI

DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE DU PRODUIT F1031V2 SELON LA NORME EN 14476

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du: 18/10/2018

Références du dossier d'analyses: n°268D25-2018-08

ESSAIS DE VIRUCIDIE:

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

Essais sur 1 souche de référence: *adénovirus*.

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

Date d'émission : 11/12/2018

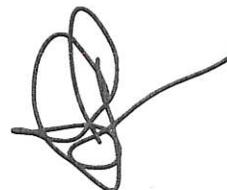
Stéphanie MOROT-BIZOT
Docteur en microbiologie
Chargée de l'étude

Professeur Georges HERBEIN
Professeur des Universités Praticien Hospitalier
Expert scientifique



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

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



SOMMAIRE

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS 3

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS 3

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES 3

4. VALIDATION DE LA METHODE 4

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

6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE 6

7. CONCLUSION 6

8. ANNEXE 1 7

9. ANNEXE 2 8

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

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS

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

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

Echantillon	N° lot
F1031V2	611141

- Date limite d'utilisation optimale : non communiquée
- Fabricant : FRANKLAB
- Date de fabrication : non communiquée
- Conditions de stockage : Température ambiante et obscurité.
- Composants actifs : éthanol, isopropanol, amine tertiaire
- Aspect : liquide incolore
- Précautions d'emploi : aucune
- Diluant préconisé par le fabricant : aucun, produit prêt-à-l'emploi
- Date de réception au laboratoire : 24/10/2018
- Période de l'étude : du 02/11/2018 au 05/12/2018

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Température d'essai: 20°C ± 1°C
- Méthode de titrage: virus titré en log DICT₅₀
- Temps de contact: 5 min, 10 min et 30 min
- Concentration cible: produit pur
- Diluant du produit utilisé lors des essais: eau distillée
- Souche de virus testée: adénovirus type 5, souche adénoïde 75 (ATCC VR5), cultivé sur cellules HEp-2, 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

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

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 6,875 log DICT₅₀ pour l'adénovirus.
- 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 1,625 logs après 30 min d'inactivation par le formaldéhyde pour l'adénovirus.
- 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 à l'adénovirus. Les titres de virus mis en contact avec les cellules traitées avec le produit et les cellules non traitées ont une différence inférieure à 1,0 log (la différence est de 0,250 log).
- La différence de titre entre l'essai de suspension virale et le contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit F1031V2 est inférieure à 0,5 log (0,0 log DICT₅₀ essai 1 et 0,125 log DICT₅₀ essai 2)

7. CONCLUSION

Les essais réalisés sur le produit F1031V2 lot n° 611141 ont démontré:

- que le produit **F1031V2 employé pur, a une activité virucide sur l'adénovirus** selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A1, pour 10 minutes de contact à 20°C, en conditions de saleté.

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

8. ANNEXE 1

Lignée cellulaire utilisée : cellules HEP-2 (RD-Biotech réf. 84011, lot n°110315-118)

Viral strain: adénovirus type 5, souche adénoïde 75 (ATCC réf. VR-5, lot n°3679877)

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

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

9. ANNEXE 2

Tableau A1 - Titrage de l'adénovirus par effet cytopathique, par la méthode de calcul Spaerman-Kärber :

$\log \text{DICT}_{50} = 6,875$

Dilution (- log)	Résultat	% résultats positifs
-3	44444444	100
-4	44444444	100
-5	44444444	100
-6	11111111	100
-7	11100000	37,5
-8	00000000	0
-9	00000000	0
-10	00000000	0
Somme des % de cultures positives		437,5

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

RAPPORT D'ESSAI

DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE DU PRODUIT F1031V2 SELON LA NORME EN 14476

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du: 18/10/2018

Références du dossier d'analyses: n°268D25-2018-10

ESSAIS DE VIRUCIDIE:

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

Essais sur 1 souche de référence: *rotavirus humain*.

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

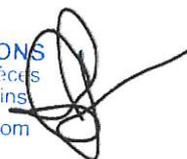
Date d'émission : 14/12/2018

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

Professeur Georges HERBEIN
Professeur des Universités Praticien Hospitalier
Expert scientifique



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



SOMMAIRE

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS 3

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS 3

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES 3

4. VALIDATION DE LA METHODE 4

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

6. VERIFICATION DE LA METHODOLOGIE 6

7. CONCLUSION 6

8. ANNEXE 1 7

9. ANNEXE 2 8

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

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES ESSAIS

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

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

Echantillon	N° lot
F1031V2	611141

- Date limite d'utilisation optimale : non communiquée
- Fabricant : FRANKLAB
- Date de fabrication : non communiquée
- Conditions de stockage : Température ambiante et obscurité.
- Composants actifs : éthanol, isopropanol, amine tertiaire
- Aspect : liquide incolore
- Précautions d'emploi : aucune
- Diluant préconisé par le fabricant : aucun, produit prêt-à-l'emploi
- Date de réception au laboratoire : 24/10/2018
- Période de l'étude : du 02/11/2018 au 05/12/2018

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Température d'essai: 20°C ± 1°C
- Méthode de titrage: virus titré en log DICT₅₀
- Temps de contact: 2 min, 5 min et 10 min
- Concentration cible: produit pur
- Diluant du produit utilisé lors des essais: eau distillée
- Souche de virus testée: rotavirus humain ATCC réf. VR-2551, cultivé sur cellules MA-104, 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

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

Titre viral :

Titration par effet cytopathique de la suspension virale d'essai du rotavirus (calculé selon la méthode de Spearman-Kärber) = 6,625 log DICT₅₀.

4. VALIDATION DE LA METHODE**a) Méthodologie**

Le produit F1031V2 a été testé sur des cultures de cellules MA-104 et une légère cytotoxicité a été observée (jusqu'à la dilution 10⁻¹).

b) Sensibilité des cellules aux virus

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

Dilution produit	Titre de virus (log DICT ₅₀)		
	Suspension virale sur cellules non traitées	Suspension virale sur cellules traitées	Différence de titre viral (log DICT ₅₀)
F1031V2 10 ⁻²	6,625	6,500	0,125

La différence de titre viral doit être inférieure à 1,0 log. Le produit F1031V2 testé à la concentration indiquée ci-dessus ne montre pas d'influence sur la méthode de titrage du rotavirus.

c) Validations de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit F1031V2 :

Concentration du produit	Substances interférentes	Titre de virus (log DICT ₅₀)	Différence avec la suspension virale d'essai
F1031V2 100 %	3 g/L de sérum albumine bovine + 3 mL érythrocytes de mouton	Essai 1: 6,625	0,000
		Essai 2: 6,625	0,000

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

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

d) Essai d'inactivation de référence

	Titre de virus (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral (log DICT ₅₀)
Suspension virale témoin	6,625	
En formaldéhyde 0,7%		
Essai d'inactivation 5 min	6,500	0,375
Essai d'inactivation 15 min	5,375	1,625
Essai d'inactivation 30 min	4,875	1,750

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 1,750 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 6,625 log DICT₅₀.

PRODUIT	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral
F1031V2	100%	2 min	20°C	3,500	3,125
		5 min		2,750	3,875
		10 min		2,375	4,250

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 6,625 log DICT₅₀.

PRODUIT	Concentration (v/v)	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral
F1031V2	100 %	2 min	20°C	3,500	3,125
		5 min		3,125	3,500
		10 min		2,375	4,250

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

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

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 6,625 log DICT₅₀ pour le rotavirus.
- La différence des titres entre témoin viral et virus de référence dans l'essai d'inactivation est comprise entre -0.5 et -2.5 après 30 min; la différence est de 1,750 logs après 30 min d'inactivation par le formaldéhyde pour le rotavirus.
- Le produit testé n'affecte pas significativement la morphologie des cellules.
- Les conditions d'essai en saleté (3 g/l 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 rotavirus. 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 0,125 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 F1031V2 est inférieure à 0,5 log (0,000 log DICT₅₀ essai 1 et 0,000 log DICT₅₀ essai 2)

7. CONCLUSION

Les essais réalisés sur le produit F1031V2 lot n° 611141 ont démontré:

- que le produit **F1031V2 employé pur, a une activité virucide sur le rotavirus** selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A1, **pour 10 minutes de contact à 20°C, en conditions de saleté.**

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

8. ANNEXE 1

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

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

Tampons et milieux de culture:

- Tampon PBS: chlorure de sodium, Dominique DUTSCHER, réf. 19032391, lot n° 836751; sodium phosphate dibasic, Sigma Aldrich, réf. S5136, lot n° BCBC7067V; sodium phosphate monobasic, Sigma Aldrich, réf. S5011, lot n° 1019K01021V
- Milieu DMEM, Dominique Dutscher, réf. P04-03590, lot n° 8870813
- Sérum de cheval, Sigma Aldrich, réf. F7524, lot n° 062M3396

Réactifs:

- Sérum albumine bovine en poudre, Sigma Aldrich, réf. P6154, lot n° M10637P6154
- Erythrocytes de mouton, Oxoïd, réf. SR 0051E, lot n° 30964000
- Formaldéhyde 37%, Sigma Aldrich, réf. F1635, lot n° BCBB3510

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

RAPPORT D'ESSAI

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE TUBERCULOCIDE DU PRODUIT
F1031V2 lingettes SELON LA NORME EN 14348**

Délivré à Mme CHAKCHOUK

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



Demande d'essai du : 18/10/2018

Références du dossier d'analyses : n°268D25-2018-24

ESSAIS DE MYCOBACTERICIDIE :

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

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

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

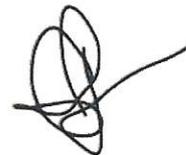
Date d'émission : 25/01/2019

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

Professeur Georges HERBEIN
Professeur des Universités Praticien Hospitalier
Expert scientifique



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



SOMMAIRE

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS 3

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS 3

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES 3

4. RESULTATS PROPREMENT DITS 4

5. CONCLUSION 4

6. FEUILLES DE RESULTATS 4

7. *Mycobacterium terrae* - ESSAI 5

8. *Mycobacterium terrae* - REPETITION 7

9. ANNEXE TECHNIQUE 9

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

1. LABORATOIRE AYANT RÉALISÉ LES IDENTIFICATIONS

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

2. IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

Echantillon	N° lot
F1031V2 lingettes	701301

Date limite d'utilisation optimale : non communiquée

Fabricant : FRANKLAB

Date de fabrication : non communiquée

Conditions de stockage : Température ambiante et obscurité.

Composants actifs : éthanol, isopropanol, amine tertiaire

Aspect : lingettes non tissées, VH 23g/m², imprégnation 280%

Précautions d'emploi : aucune

Diluant préconisé par le fabricant : aucun, produit prêt-à-l'emploi

Date de réception au laboratoire : 09/11/2018

Période de l'étude : du 29/10/2018 au 30/12/2018

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

- Concentration du produit soumis à l'essai : produit pur. Extraction du produit par essorage manuel.
- Méthode employée: dilution-neutralisation.
- Temps de contact : 5 min, 10 min et 60 min
- Température d'essai: 20°C
- Substance interférente: en conditions de saleté, sérum albumine bovine 3 g/L + érythrocytes de mouton 3 mL/L.
- Diluant du produit utilisé lors des essais : solution distillée stérile.
- Souches de mycobactéries utilisées: *Mycobacterium terrae* CIP 104321, lot n°16308 (Institut Pasteur).
- Conditions de culture: bouillon Middlebrook 7H9 ADC 10%, milieu Middlebrook 7H10 OADC 10%, à 37°C ± 1°C.

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

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

4. RESULTATS PROPREMENT DITS

Le produit lingettes F1031V2 est bien actif vis-à-vis des souches de référence utilisées, car la réduction obtenue est supérieure à 4 log:

En conditions de saleté (moyenne des répétitions) :

- pour *Mycobacterium terrae*, R = 4,89 pour 10 min de contact

5. CONCLUSION

Conformément à la norme EN 14348 (Juin 2005), le produit F1031V2 :

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

6. FEUILLES DE RESULTATS

Voir ci-après.

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

7. *Mycobacterium terrae* - ESSAI

Vérifications de la méthodologie:

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

Légende :

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

Norme: EN 14348 Produit : F1031V2 lingettes Lot N° : 701301 Etude N° : 268D25-2018-24 Date des essais : 19/11/2018	Méthode: <input checked="" type="checkbox"/> Ensemencement dans la masse <input type="checkbox"/> Ensemencement en surface <input checked="" type="checkbox"/> Nombre de boîtes de Pétri/mL : 2	Neutralisant : polysorbate 80 (30g/L) + jaune d'œuf 5% Température des essais : 20°C Substance interférente : 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton Température d'incubation : 37°C ± 1°C Diluant : eau distillée stérile
---	--	---

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

	Suspension de validation		Validation A		Validation B		Validation C		Suspension d'essai		Mode opératoire aux concentrations (v/v)						
	VC1	VC2	VC1	VC2	VC1	VC2	VC1	VC2	VC1	VC2	5 min		10 min		60 min		
											VC1	VC2	VC1	VC2	VC1	VC2	
Mycobacterium terreae	66	57	61	58	53	58	50	47	1.10 ⁻⁷	227	217	1.10 ⁰	>660	301	298	46	35
	\bar{X}	61,5	\bar{X}	55,5	\bar{X}	55,5	\bar{X}	48,5	1.10 ⁻⁸	25	22	1.10 ⁻¹	266	34	30	8	5
	30 ≤ Nv0 ≤ 160		A ≥ 0,5 * Nv0	B ≥ 0,5 * Nv0	C ≥ 0,5 * Nv0							1.10 ⁻²	30	5	4	2	0
	x oui <input type="checkbox"/> non		x oui <input type="checkbox"/> non	x oui <input type="checkbox"/> non	x oui <input type="checkbox"/> non							1.10 ⁻³	4	3	1	0	0
									Log N	9,35		Na	2,60.10 ⁴	3,01.10 ³	4,05.10 ²		
									Log N0	8,35		Log Na	4,41	3,48	2,61		
									8,17 ≤ log N0 ≤ 8,70?			Log R	3,94	4,87	5,74		
									x oui <input type="checkbox"/> non								

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

8. *Mycobacterium terrae* - REPETITION

Vérifications de la méthodologie:

- N est compris entre $1,5 \times 10^9$ UFC/ml et $5,0 \times 10^9$ UFC/ml
- $7,88 \leq \log N_0 \leq 8,40$
- $NW > 100$ UFC/25 cm² sur les champs 2 à 4
- Nv_0 est compris entre 3×10^1 UFC/ml et $1,6 \times 10^2$ UFC/ml
- B et C sont égaux ou supérieurs à $0,5 \times Nv_0$

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

Dc0 = témoin de séchage à t0

Dct = témoin de séchage à t

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

Norme: EN 14348 Produit : F1031V2 lingettes Lot N° : 701301 Etude N° : 268D25-2018-24 Date des essais : 20/11/2018	Méthode: <input checked="" type="checkbox"/> Ensemencement dans la masse <input type="checkbox"/> Ensemencement en surface <input checked="" type="checkbox"/> Nombre de boîtes de Pétri/mL : 2	Neutralisant : polysorbate 80 (30g/L) + jaune d'œuf 5% Température des essais : 20°C Substance interférente : 3 g/L BSA + 3 mL/L érythrocytes de mouton Température d'incubation : 37°C ± 1°C Diluant : eau distillée stérile
---	--	---

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

	Suspension de validation		Validation A		Validation B		Validation C		Suspension d'essai		Mode opératoire aux concentrations (v/v)						
	VC1	VC2	VC1	VC2	VC1	VC2	VC1	VC2	VC1	VC2	5 min		10 min		60 min		
											VC1	VC2	VC1	VC2	VC1	VC2	
Mycobacterium terrae	48	53	56	63	61	60	34	41	1.10 ⁷	171	1.10 ⁰	662	662	223	191	49	50
	\bar{X}	50,5	\bar{X}	59,5	\bar{X}	60,5	\bar{X}	37,5	1.10 ⁸	20	1.10 ⁻¹	401	389	26	31	6	6
	30 ≤ Nv0 ≤ 160		A ≥ 0,5 * Nv0		B ≥ 0,5 * Nv0		C ≥ 0,5 * Nv0				1.10 ²	55	46	2	0	1	1
	x oui <input type="checkbox"/> non		x oui <input type="checkbox"/> non		x oui <input type="checkbox"/> non		x oui <input type="checkbox"/> non				1.10 ³	6	10	0	0	0	0
								Log N	9,23	Na	4,05.10 ⁴	2,14.10 ³	4,95.10 ²				
								Log NO	8,23	Log Na	4,61	3,33	2,69				
								8,17 ≤ log NO ≤ 8,70?	x oui <input type="checkbox"/> non	Log R	3,62	4,90	5,54				

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

9. ANNEXE TECHNIQUE

Milieux de culture utilisés, stérilisés par autoclavage :

MILIEUX DE CULTURE

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

SUBSTANCES INTERFÉRENTES :

Sérum Albumine Bovine en poudre, Fraction V, Dominique Dutscher, réf.P6154, lot D1304039
 Sang de mouton, Analytic Lab, réf. 08449, lot n°bcbj3984V.

DILUANT Solution Tryptone-Sel (TS)

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

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

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

NEUTRALISANT

Ingrédients par litre d'eau distillée:

Polysorbate 80, SIGMA ALDRICH, réf. 59924, lot n° BCBJ6978V ----- 30 g
 Jaune d'œuf frais ----- 50 ml

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

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

