



Toulouse, le 4 Février 2021

**ETUDE N°20-2778
RAPPORT D'ESSAI N°21-1635**

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE VIRUCIDE
DES ANTISEPTIQUES ET DES DESINFECTANTS CHIMIQUES
UTILISES EN MEDECINE HUMAINE
NF EN 14476+A2 (JUILLET 2019)
DESINFECTIONS DE SURFACE
CONDITIONS OBLIGATOIRES DE PROPRETE
ACTIVITE VIRUCIDE A SPECTRE LIMITE**

Promoteur de l'étude

**CIEL VERT INTERNATIONAL
6, YOFF RANRHAR
Route de l'aéroport
DAKAR SENEGAL**

Laboratoire Essai

**FONDEREPHAR
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35 Chemin des Maraîchers
31062 TOULOUSE cedex
FRANCE**

**Dr. Laïla HADDIOUI
Responsable Etude**

**Dr. Jocelyne BACARIA
Responsable Qualité**

La reproduction de ce document n'est autorisée que sous la forme de fac-similé photographique intégral

I - IDENTIFICATION DU LABORATOIRE D'ESSAI

FONDEREPHAR

Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35 chemin des Maraîchers
31062 TOULOUSE Cedex 9

II - IDENTIFICATION DE L'ECHANTILLON

Nom du produit	CIEL VERT 300B
Numéro de lot	20201010
Substance active	Benzalkonium
Date de péremption	12/2021
Code interne	20-2778-1
Fournisseur	CIEL VERT
Période d'analyse	Octobre 2020 - Janvier 2021

Conditions de stockage pendant la période de manipulation : Température ambiante

La reproduction de ce document n'est autorisée que sous la forme de fac-similé photographique intégral

L'accréditation COFRAC atteste uniquement de la compétence du laboratoire pour les essais couverts par l'accréditation.

Le Cofrac est signataire des accords de reconnaissance multilatéraux d'EA¹ et/ou d'ILAC² et/ou d'IAF³ pour les activités d'essais.

1 European cooperation for Accreditation

2 International Laboratory Accreditation Cooperation

3 International Accreditation Forum

III- METHODE D'ESSAI

III-1 Virus

Nom: ADENOVIRUS TYPE 5
Origine: ATCC
Référence: VR-5
Numéro de lot fournisseur: 58486654
Numéro de lot interne: SS-1-181212 (Passage N°1) et SS-3-290518 (Passage N°3)

- Nom: NOROVIRUS MURIN
- Origine: Freidrich-Loeffler-Institut
- Référence: FLI-RVB-651
- Numero de lot du fournisseur: 4/200409/220409
- Numéro de lot interne: SS-5-110419 (Passage N°5) et SS-4-271118 (Passage N°4)

III-2 Cellules réceptrices

Nom: HELA (Adénovirus type 5)
Origine: ATCC
Référence: CCL-2
Numéro de lot fournisseur: 4440136
Numéro de lot interne: WCB-140613 (Passage N°20 et N°36)

- Nom : Cellules RAW 264-7 (Norovirus Murin)
- Origine: ATCC
- Référence ATCC: TIB-71
- Numero de lot ATCC: 5822175
- Numéro de lot interne: WCB-210912 (Passages N°25 et 55)

IV -CONDITIONS EXPERIMENTALES

IV-1 Condition d'analyse

- Concentrations d'essai: 30% (V/V), 10% (V/V) et 3% (V/V)
- Temps de contact: 60 minutes $\pm$ 10 s
- Température test: 30°C $\pm$ 1°C
- Température d'incubation: 36°C $\pm$ 1°C
- Substance interférente: BSA 0,3 g/l (Lots N°338, N°361 et N°364)
- Filtre-tamis moléculaire : Séphadex LH20 (Lots N°9803 et N°10106)

- **Substance de référence:** Formaldéhyde (Lot N°9672)
- **Diluant produit:** Eau dure (Lots N°780, N°781, N°769 et N°776)
- **Milieu de culture:** MEM (Lots N°2655 et N°2763) cellules HELA
DMEM (Lots N° 2700 et N°2752 Cellules RAW 264-7)
- **Tampon Phosphate Salin (PBS)** Lots N°MS00J1 et N°MS00PN
- **Aspect dilution produit :** Préparation homogène
- **Stabilité et aspect du mélange pendant l'essai :** Préparation homogène pendant la durée de l'essai.

IV-2 Méthodes

IV-2-1 Titrage de la suspension virale

Le titrage est effectué en microplaques par la méthode de cellules en suspension. L'effet cytopathique est déterminé après 4 jours de culture.

L'estimation du nombre d'unités infectieuses est déterminée par la méthode de SPAERMAN-KÄRBER en calculant le logarithme négatif du point limite 50% ($\lg \text{DICT}_{50}$) par la formule suivante : $\lg \text{DICT}_{50} = \text{Logarithme négatif de la plus haute concentration de virus utilisée} - [(\text{Somme de \% affecté à chaque dilution}/100 - 0,5) \times (\lg \text{ de dilution})]$.

IV-2-2 Cytotoxicité des solutions de produits

IV-2-2-1 Cytotoxicité directe

Ce test permet de déterminer la concentration du désinfectant qui n'induit pas de signe de toxicité vis-à-vis de la lignée cellulaire permettant la mise en évidence de l'effet du virus à tester.

IV-2-2-2 Cytotoxicité indirecte : tamisage moléculaire

Elimination de la cytotoxicité du produit testé

L'arrêt de l'activité du produit est réalisé par la technique du tamisage moléculaire à l'aide d'un filtre-tamis, c'est-à-dire Séphadex.

La neutralisation du formaldéhyde et du produit a été validé par passage sur Séphadex de la dilution 1/20.

La neutralisation du produit essai a été validé par passage sur Séphadex de la dilution 1/20.

IV-2-3 Sensibilité des cellules aux virus

Des titrages comparatifs sont réalisés sur les cellules traitées ou non par le désinfectant afin de vérifier que le désinfectant à la concentration subcytotoxique ne modifie pas le comportement du virus vis-à-vis des cellules réceptrices.

IV-2-4 Contrôle de l'efficacité de l'arrêt du désinfectant à T0

Immédiatement après la préparation du mélange d'essai au temps 0, la réaction est stoppée dans la glace pendant 30 min $\pm$ 10 s et ensuite le titrage viral est réalisé.

IV-2-5 Essai d'inactivation du virus de référence

Le virus d'essai est soumis à des essais de virucidie au formaldéhyde afin de contrôler l'uniformité du comportement du virus testé à des agents chimiques au cours du temps (30 min et 60 min).

V- RESULTATS

ADENOVIRUS TYPE 5

V-1-1 Cytotoxicité des solutions de produit

V-1-1-1 Cytotoxicité directe

Concentration non cytotoxique à partir de 3.0.10⁻³% (V/V)

V-1-1-2 Cytotoxicité indirecte

Concentration non cytotoxique à partir de 1.5 10⁻¹% (V/V)

V-1-2 Sensibilité des cellules aux virus

S1 (en présence du produit): lg DICT₅₀ = 7.38

S2 (en absence de produit): lg DICT₅₀ = 7.13

S2 - S1 = 0.25

Sensibilité valide (limite S2 - S1 < 1 lg)

V-2 Essai

V-2-1 Validations

V-2-1-1 Contrôle des témoins viraux en présence et en absence de Séphadex

- Avant séphadex

lg DICT₅₀ = 6.50

- Après Séphadex

lg DICT₅₀ = 6.38

Différence $\leq 0,5$ lg (contrôle valide)

V-2-1-2 Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant à T0

I1 (en présence de produit): lg DICT₅₀ = 7.25

I2 (en absence de produit): lg DICT₅₀ = 7.63

Différence $\leq 0,5$ lg (contrôle valide)

V-2-1-3 Essai d'inactivation du virus de référence

V-2-1-3-1 Cytotoxicité directe

Concentration non cytotoxique à partir $7.10^{-7}\%$ (V/V)

V-2-1-3-2 Cytotoxicité indirecte

Concentration non cytotoxique à partir $3.5.10^{-4}\%$ (V/V)

V-2-1-3-3 Titrage du témoin viral PBS

Avant Séphadex

lg DICT₅₀ PBS = 6.88

Après Séphadex

lg DICT₅₀ PBS = 6.50

Différence $\leq 0,5$ lg (contrôle valide)

V-2-1-3-4 Résultats de titrage de formaldéhyde

Temps de contact	30 min	60 min
Ig DICT ₅₀	2.75	2.38
Réduction logarithmique	3.75	4.12

V-2-2 Résultats du produit essai :

Adénovirus type 5 - 60 min ± 10S - 30°C±1°C								
-log Dilution	En présence des dilutions de produit testé						Contrôle	
	Degré de l'effet cytopathique			% de puits positifs			Degré de l'effet cytopathique	% de puits positifs
	30 %(V/V)	10%(V/V)	3%(P/V)	30%(V/V)	10 %(V/V)	3 %(V/V)		
1	30000000	43221021	44444444	12.5%	84.5%	100%	44444444	100%
2	00000000	00200010	44444444	0%	25%	100%	44444444	100%
3	00000000	00000000	44444444	0%	0%	100%	44444444	100%
4	00000000	00000000	44444444	0%	0%	100%	44444444	100%
5	00000000	00000000	44444444	0%	0%	100%	44444444	100%
6	00000000	00000000	02230000	0%	0%	37.5%	10002132	62.5%
7	00000000	00000000	00000000	0%	0%	0%	00000003	12.5%
8	00000000	00000000	00000000	0%	0%	0%	00002000	12.5%
9	00000000	00000000	00000000	0%	0%	0%	00000000	0%
10	00000000	00000000	00000000	0%	0%	0%	00000000	0%
Ig DICT ₅₀				0.63	1.63	5.88		6.38

* 1 à 4 : Présence de virus, avec effet cytopathique observé dans 8 puits cellulaires

0 : Absence de virus, avec absence d'effet cytopathique

V-2-3 Réductions logarithmiques

Temps de contact	60 minutes ± 10 S		
Concentrations	30% (V/V)	10% (V/V)	3% (V/V)
Réduction Ig	5.75	4.75	0.5

NOROVIRUS MURIN

V-1-1 Cytotoxicité des solutions de produit

V-1-1-1 Cytotoxicité directe

Concentration non cytotoxique à partir de $3.0.10^{-5}\%$ (V/V)

V-1-1-2 Cytotoxicité indirecte

Concentration non cytotoxique à partir de 0.01% (V/V)

V-1-2 Sensibilité des cellules aux virus

S1 (en présence du produit): $\lg \text{DICT}_{50} = 7.88$

S2 (en absence de produit): $\lg \text{DICT}_{50} = 8.0$

$S2 - S1 = 0.12$

Sensibilité valide (limite $S2 - S1 < 1 \lg$)

V-2 Essai

V-2-1 Validations

V-2-1-1 Contrôle des témoins viraux en présence et en absence de Séphadex

- Avant séphadex

$\lg \text{DICT}_{50} = 5.13$

- Après Séphadex

$\lg \text{DICT}_{50} = 5.25$

Différence $\leq 0,5 \lg$ (contrôle valide)

V-2-1-2 Contrôle de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du désinfectant à T0

I1 (en présence de produit): $\lg \text{DICT}_{50} = 6.88$

I2 (en absence de produit): $\lg \text{DICT}_{50} = 7.0$

Différence $\leq 0,5 \lg$ (contrôle valide)

V-2-1-3 Essai d'inactivation du virus de référence

V-2-1-3-1 Cytotoxicité directe

Concentration non cytotoxique à partir $7.10^{-7}\%$ (V/V)

V-2-1-3-2 Cytotoxicité indirecte

Concentration non cytotoxique à partir 3.5.10⁻⁴% (V/V)

V-2-1-3-3 Titrage du témoin viral PBS

- Avant séphadex

lg DICT₅₀ = 5.63

- Après Séphadex

lg DICT₅₀ = 5.50

Différence ≤ 0,5 lg (contrôle valide)

V-2-1-3-4 Résultats de titrage de formaldéhyde

Temps de contact	30 min	60 min
lg DICT ₅₀	3.0	1.88
Réduction logarithmique	2.50	3.62

V-2-2 Résultats du produit essai :

Norovirus murin - 60 min ± 10S - 30°C±1°C								
-log Dilution	En présence des dilutions de produit testé						Contrôle	
	Degré de l'effet cytopathique			% de puits positifs			Degré de l'effet cytopathique	% de puits positifs
	30 %(V/V)	10%(V/V)	3%(P/V)	30%(V/V)	10 %(V/V)	3 %(V/V)		
1	00000000	03210310	44444444	0%	62.5%	100%	44444444	100%
2	00000000	00000000	44444444	0%	0%	100%	44444444	100%
3	00000000	00000000	430440132	0%	0%	75%	44444444	100%
4	00000000	00000000	03030200	0%	0%	37.5%	44444444	100%
5	00000000	00000000	00000000	0%	0%	0%	32021033	75%
6	00000000	00000000	00000000	0%	0%	0%	00000000	0%
7	00000000	00000000	00000000	0%	0%	0%	00000000	0%
8	00000000	00000000	00000000	0%	0%	0%	00000000	0%
9	00000000	00000000	00000000	0%	0%	0%	00000000	0%
10	00000000	00000000	00000000	0%	0%	0%	00000000	0%
lg DICT ₅₀				≤0.5	1.13	3.63		5.25

* 1 à 4 : Présence de virus, avec effet cytopathique observé dans 8 puits cellulaires

0 : Absence de virus, avec absence d'effet cytopathique

V-2-3 Réductions logarithmiques

Temps de contact	60 minutes $\pm$ 10 S		
Concentrations	30% (V/V)	10% (V/V)	3% (V/V)
Réduction lg	≥ 4.75	4.12	1.62

VI - CONCLUSION

Selon la norme NF EN 14476 +A2 (Juillet 2019), le produit CIEL VERT 300B (Lot N°20201010) pour la désinfection des surfaces en condition de propreté - présente une activité virucide à spectre limité aux concentrations d'essai 30% (V/V) et 10 % (V/V) au temps de contact 60 $\pm$ 10 S minutes à 30°C $\pm$ 1 vis-à-vis de l'Adénovirus type 5 et du Norovirus murin

Ces résultats ne valent que pour le produit soumis à l'essai et s'appliquent à l'échantillon tel qu'il a été reçu.