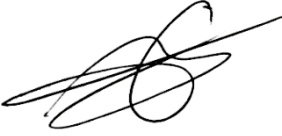
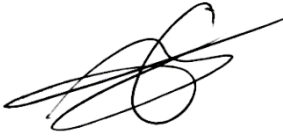


HCLO SAS
5 Avenue des Renardières
77250 ECUELLES

**DETERMINATION DE L'ACTIVITE
VIRUCIDE DU PRODUIT
Healse
SELON LA NORME EN 14476+A2:07-2019**

**RAPPORT D'ANALYSES
R/20/19910**

n° Version	Validation - Direction scientifique et technique / Direction qualité	Vérification - Adjoint à la Direction scientifique et technique	Date d'édition de la version	Date de modification
1	J.-F. LACROIX 	J.-F. LACROIX 	03/07/2020	/

Dossier 5228/20/00001
Rapport R/20/19910

Ce rapport ne concerne que l'échantillon soumis à l'analyse. Reproduction partielle interdite sans l'accord d'Analytice. Seul le rapport original fait foi.
F-63 – V2 – 22/04/2009

03/07/2020
Page 1/13

SOMMAIRE

	Page
1. Cadre de la mission	3
2. Identification des échantillons	3
3. Conditions expérimentales	3
4. Validation de la méthode	4
4.1. Cytotoxicité	4
4.2. Sensibilité des cellules aux virus	4
4.3. Validations de l'efficacité de l'arrêt de l'activité du produit	4
4.4. Essai d'inactivation de référence	4
5. Essais proprement dits – Calcul de l'activité virucide	5
6. Vérification de la méthodologie	6
7. Conclusion	7

ANNEXES

Annexes : pages 8 à 13

IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS

Nos références	Informations fournies par le client		Date de fabrication	Date d'analyse
	Vos références	Description		
E/20/80252	Healse	Solution désinfectante	/	Du 01 au 29/06/2020

Votre commande : **200998-2 Bon Pour Accord**

1. Cadre de la mission

La Société HCLO SAS demande à la Société Analytice de faire réaliser une détermination de l'activité virucide du produit **Healse** selon la norme EN 14476+A2:07-2019 - antiseptiques et désinfectants chimiques – Essais quantitatifs de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide dans le domaine médical.

2. Identification des échantillons

- Fabricant : HCLO SAS.
- Date de fabrication : produit généré à partir de l'appareil fourni par le fabricant, selon le protocole fourni.
- Date limite d'utilisation optimale : non communiquée.
- Conditions de stockage : température ambiante et obscurité.
- Substances actives : hypochlorite de sodium.
- Aspect : liquide incolore.
- Précautions d'emploi : aucune.
- Diluant préconisé par le fabricant : /.
- Date de réception au laboratoire : 28/05/2020.
- Période de l'étude : du 01 au 29/06/2020.

3. Conditions expérimentales

- Température d'essai : 20°C ± 1°C.
- Méthode de titrage : log DICT₅₀.
- Temps de contact : 30 s.
- Concentration finale : 80%, 50% et 10%.
- Diluant du produit utilisé lors des essais : eau distillée.
- Souches virales : **Vaccinia virus** ATCC VR-1508, cultivé sur cellules BHK-21, sous atmosphère à 5% CO₂.
- Substances interférentes : 0,3 g/L BSA.
- 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) : 6,500 log DICT₅₀.

4. Validation de la méthode

4.1. Cytotoxicité

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

4.2. 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)			
	Dilution du produit	Suspension virale sur cellules non traitées	Suspension virale sur cellules traitées	Différence de titre viral (log DICT ₅₀)
Healse	10^{-2}	6,500	6,000	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).

4.3. 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
Healse 80%	0,3 g/L BSA	Essai 1 : 6,500	0,000
		Essai 2 : 6,500	0,000

4.4. Essai d'inactivation de référence

	Titre de virus (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral (log DICT ₅₀)
Suspension virale témoin	6,500	
En formaldéhyde 0,7%		
Essai d'inactivation 5 min	5,875	0,625
Essai d'inactivation 15 min	5,375	1,125
Essai d'inactivation 30 min	4,875	1,625

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 1,625 log après 30 min et les conditions de la norme sont donc remplies.

5. Essais proprement dits – Calcul de l'activité virucide

Essai 1

La suspension virale témoin a une concentration de **6,500 log DICT₅₀**

PRODUIT	Concentration	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral
Healse	80%	30 s	20°C	2,250	4,250
	50%			3,500	3,000
	10%			5,000	1,500

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 **6,500 log DICT₅₀**

PRODUIT	Concentration	Temps de contact	Température de contact	Titre après essai (log DICT ₅₀)	Réduction du titre viral
Healse	80%	30 s	20°C	2,250	4,250
	50%			3,625	2,875
	10%			5,375	1,125

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

6. Vérification de la méthodologie

Les essais ont été validés selon la norme européenne EN 14476+A2:07-2019 :

- Le titre de la suspension virale d'essai est suffisamment important pour permettre une observation de réduction de 4 log après essais :
 - o Il est de 6,500 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 comprise entre -0.5 et -2.5 après 30 min :
 - o La différence est de 1,625 log après 30 min d'inactivation par le formaldéhyde pour le virus de la vaccine.
- Le produit testé n'affecte pas significativement la morphologie des cellules.
- Les conditions d'essai en propreté (0,3 g/l BSA) n'affectent pas l'infectivité du virus de la vaccine.
- Le produit testé ne réduit pas la sensibilité :
 - o 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).

7. Conclusion

Les essais réalisés sur le produit **Healse** ont démontré :

- Que le produit **Healse**, employé dès 80% a une activité virucide sur le virus de la vaccine, selon la méthodologie de la norme NF EN 14476+A2:07-2019, pour 30 secondes de contact à 20°C, en conditions de propreté.
- Que conformément à la norme EN 14476+A2:07-2019, le produit **Healse**, est donc efficace sur tous les virus enveloppés (dont H1N1 et coronavirus), dès 80% pour 30 secondes de contact à 20°C, en conditions de propreté (point 4, tableau 1 page 9 « L'essai portant sur "l'activité virucide contre les virus enveloppés [avec le virus de la vaccine comme virus modèle]" couvrira uniquement tous les virus enveloppés »).

ANNEXES

ANNEXE 1

Virus de la vaccine :

- 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 foetal, 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

ANNEXE 2

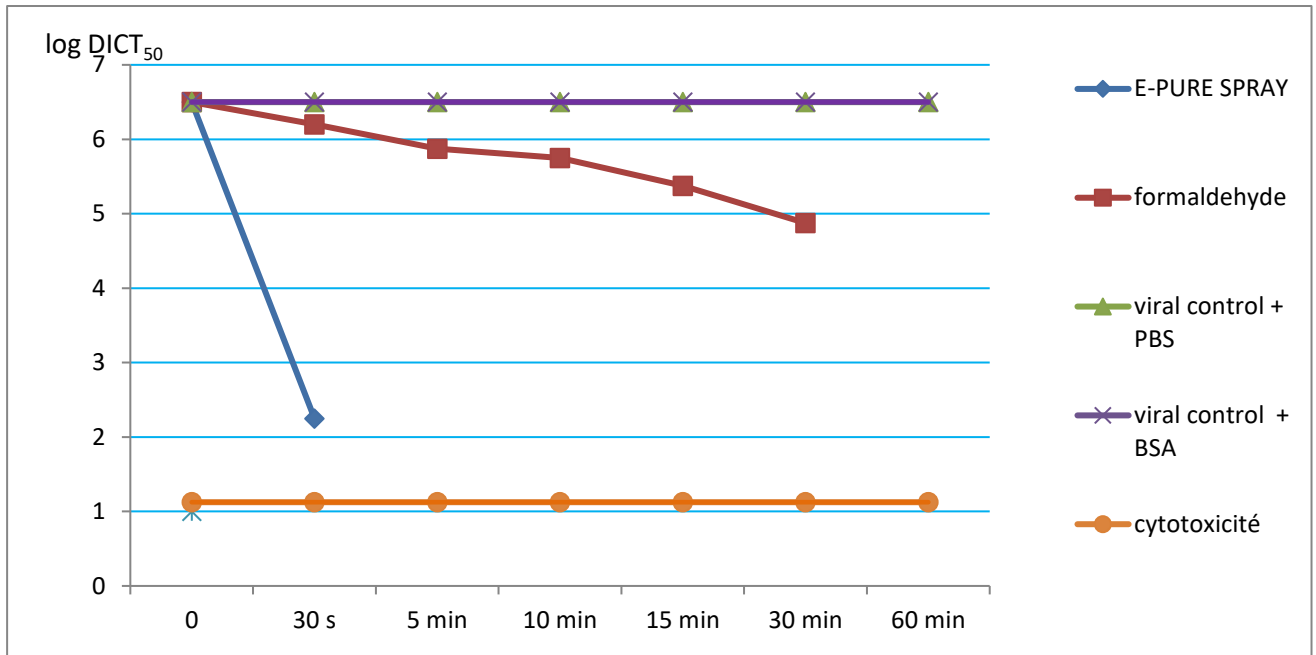
Table A1 – Titrage du virus de la vaccine par effet cytopathique, par la méthode de calcul Spaerman-Kärber :

Log DICT₅₀ = 6,500

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

Figure 1 – représentations graphiques des résultats des essais :

Essai 1



Essai 2

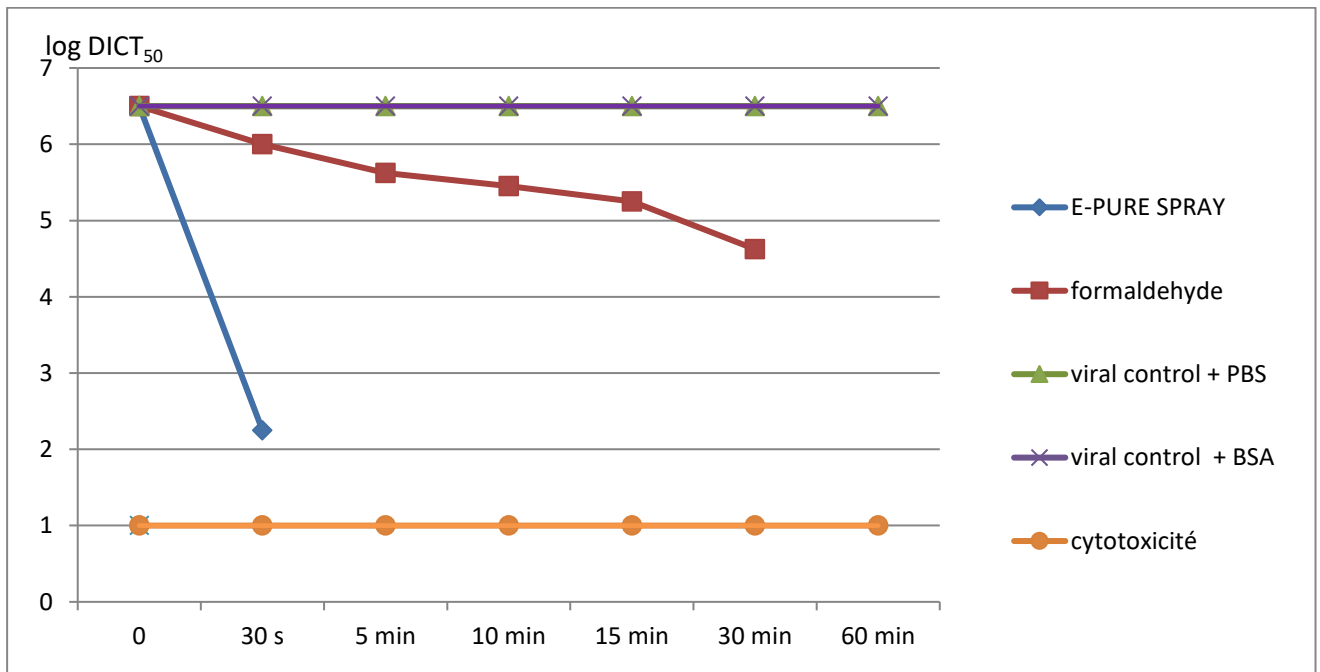


Tableau A2 - Tableau de résultats du produit Healse soumis à essai contre le virus de la vaccine en conditions de propreté (0,3 g/L BSA)

PRODUIT	Concentration	Substance interférente	Niveau de cytotoxicité	Lg TCID ₅₀						Reduction		
				0	30 s	5 min	10 min	15 min	30 min		60 min	
HEALSE ESSAI 1	80,00%	0,3 g/l BSA	1,125	6,500	2,250	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	30 s R = 4,250	
HEALSE ESSAI 2	80,00%	0,3 g/l BSA	1,000	6,500	2,250	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	30 s R = 4,250	
Formaldéhyde ESSAI 1	0,70%	PBS	1,875	6,500	N.T.	5,875	N.T.	5,375	4,875	N.T.		
Formaldéhyde ESSAI 2	0,70%	PBS	2,000	6,500	N.T.	5,625	N.T.	5,250	4,625	N.T.		
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 1	N.A.	PBS	N.A.	6,500	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,500		
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 1	N.A.	0,3 g/l BSA	N.A.	6,500	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,500		
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 2	N.A.	PBS	N.A.	6,500	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,500		
Contrôle viral d'infectivité ESSAI 2	N.A.	0,3 g/l BSA	N.A.	6,500	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	6,500		
Sensibilité des cellules au virus	10 ⁻¹	N.A.	Cellules non traitées	6,375								
		N.A.	Cellules traitées	6,000								

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

ESSAI 1

	Concentration	Substance interférente	Temps de contact	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	
HEALSE ESSAI 1	80,00%	0,3 g/l BSA	30 s	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
	50,00%			4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
	10,00%		4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	
4444		4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000			
HEALSE cytotoxicité	80,00%	0,3 g/l BSA	N.A.	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
				4000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
Formaldéhyde	0,70%	PBS	5	4444	4444	4444	4444	4444	4440	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	
4444	4444	4444		4444	4440	0000	0000	0000	0000				
30	4444	4444	4444	4444	4440	0000	0000	0000	0000				
	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000				
Formaldéhyde (cytotoxicité)	0,70%	PBS	N.A.	4444	4000	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	
Contrôle viral d'infectivité	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
				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				
Contrôle viral d'infectivité	N.A.	0,3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	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				

ESSAI 2

	Concentration	Substance interférente	Temps de contact	Dilutions									
				-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	
HEALSE ESSAI 2	80,00%	0,3 g/l BSA	30 s	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
				4444	4400	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
	4444			4444	4444	4000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
	4444			4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
	Contrôle viral		4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
			4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
HEALSE cytotoxicité	80,00%	0,3 g/l BSA	N.A.	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
Formaldéhyde	0,70%	PBS	5	4444	4444	4444	4444	4444	4000	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	
			15	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4400	0000	0000	0000	0000	
			30	4444	4444	4444	4444	4000	0000	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	
Formaldéhyde (cytotoxicité)	0,70%	PBS	N.A.	4444	4400	0000	0000	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	
Contrôle viral d'infectivité	N.A.	PBS	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
Contrôle viral d'infectivité	N.A.	0,3 g/l BSA	0	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
			60	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	

Sensibilité des cellules au virus :

PRODUIT	Dilution	Substance interférente		Dilutions								
				-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	
HEALSE	10 ⁻¹	0,3 g/l BSA	Cellules non traitées	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000
			Cellules traitées	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	