

Effacité virucide d'un désinfectant pour usage sur les surfaces environnementales inanimées

Virus : Virus de la grippe A (H1N1)

Désignation du Produit : Sanosil S010

ATS Labs, Eagan MN 55121, USA
Mai 2009



Sanosil Ltd. Eichtalstrasse 49 CH-8634 Hombrechtikon Suisse
Tél.: +41 55 254 00 54 Fax: +41 55 254 00 59 e-mail: info@sanosil.com

Des T 261/en

© Sanosil 2009

Mai 2009

RAPPORT D'ETUDE FINAL

TITRE DE L'ETUDE

Efficacité virucide d'un désinfectant pour usage
sur les surfaces environnementales inanimées

Virus : Virus de la grippe A (H1N1)

DESIGNATION DU PRODUIT

Sanosil S010
Lot Z0905B8 et Lot Z2012B7

EXIGENCES RELATIVES AUX DONNEES

U.S. EPA 40 CFR Part 158,
"Data Requirements for Registration"
Directives pour l'évaluation des pesticides - Subdivision G, 91-2(f)

AUTEUR

Karen M. Ramm, B.A.
Directeur d'Etude

DATE DE FIN DE L'ETUDE

27 mai 2009

LABORATOIRE EXECUTANT

ATS Labs
1285 Corporate Center Drive, Suite 110
Eagan, MN 55121

PROMOTEUR

Sanosil International, LLC
100 Dean Drive
Newark, DE 19711

REPRESENTANT DU PROMOTEUR

Lewis & Harrison, LLC
122 C Street, NW, Suite 740
Washington, DC 20001

NUMERO DU PROJET

A07680

Page 1 / 23

RAPPORT D'ETUDE

INFORMATIONS GENERALES SUR L'ETUDE

Titre de l'étude :	Efficacité virucide d'un désinfectant pour usage sur les surfaces environnementales inanimées
Projet N° :	A07680
Protocole N° :	LEH06042909.SFLU
Promoteur :	Sanosil International, LLC 100 Dean Drive Newark, DE 19711
Représentant du promoteur :	Lewis & Harrison, LLC 122 C Street, NW, Suite 740 Washington, DC 20001
Centre d'essais :	ATS Labs 1285 Corporate Center Drive, Suite 110 Eagan, MN 55121

IDENTITE DE LA SUBSTANCE A L'ESSAI

Nom de la substance à l'essai :	Sanosil S010
Lot(s) :	Lot 20905B8 et Lot Z2012B7

Caractérisation de la substance à l'essai

La caractérisation de la substance à l'essai (teneur, stabilité, solubilité, conservation, etc.) est de la responsabilité du promoteur.

DATES DE L'ETUDE

Date de réception de l'échantillon :	27 janvier 2009
Date de début de l'étude :	1 ^{er} mai 2009
Date de début des tests :	9 mai 2009
Date de fin des tests :	15 mai 2009
Date de fin de l'étude :	27 mai 2009

OBJECTIF

Cette étude avait pour but d'évaluer l'efficacité virucide d'une substance expérimentale contre le virus de la grippe A (H1N1) selon des critères et méthodes d'essai validés par l'Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis (U.S. EPA), pour l'enregistrement d'un produit comme virucide.

RESUME DES RESULTATS

Substance à l'essai : Sanosil S010, Lot Z0905B8 et Lot Z201267
Dilution : Prêt à l'emploi (PAE)
Virus : Virus de la grippe A (H1 N1), ATCC VR-333, souche A/Swine/Iowa/15/30
Temps d'exposition : Dix minutes
Température d'exposition : Température ambiante (20,0°C)
Charge organique : Sérum fœtal de bovin 1 %
Résultat d'efficacité : Deux lots de Sanosil S010 répondaient aux critères d'essai spécifiés dans le protocole d'étude. Les résultats indiquent une **inactivation totale** du virus de la grippe A (H1N1) dans les conditions d'essai requises par l'U.S. EPA pour les revendications d'activité virucide.

SYSTEME EXPERIMENTAL

1. Virus
La souche A/Swine/Iowa/15/30 de virus de la grippe A (H1N1) utilisée pour cette étude provient de l'American Type Culture Collection, Manassas, VA (ATCC VR-333). La solution-mère de virus a été préparée en recueillant le surnageant de culture des cellules infectées. Les cellules ont été lysées et les débris cellulaires éliminés par centrifugation à environ 2000 t/min pendant 5 minutes à environ 4°C. Le surnageant a été réparti en aliquotes et la solution-mère de virus, à haut titre, a été conservée à une température inférieure ou égale à -70°C jusqu'au jour d'utilisation. Ce jour-là, une aliquote de solution-mère de virus (Lot SF-14, ATS Labs) a été prélevée, décongelée et maintenue au réfrigérateur jusqu'au moment du dosage. Les cultures de solution-mère de virus contenaient 1% de sérum fœtal de bovin comme charge organique. Le virus testé a démontré les effets cytopathiques (ECP) typiques des virus grippaux sur les cellules de rein de singe Rhesus (RMK).
2. Cultures cellulaires d'essai
Les cellules RMK proviennent de ViroMed Laboratories, Inc., Division de Culture Cellulaire. Les cultures ont été maintenues et utilisées à la densité appropriée dans le matériel pour culture tissulaire du laboratoire, à 36-38°C, sous atmosphère humidifiée à 5-7 % de CO₂.
3. Milieu d'essai
Le milieu d'essai utilisé dans cette étude était le Milieu Essentiel Minimum (MEM) supplémenté avec 1 % de sérum fœtal bovin (FBS) inactivé par chauffage, 10 µg/ml de gentamicine, 100 U/ml de pénicilline et 2,54 µg/ml d'amphotéricine B.

Le tableau suivant répertorie les groupes d'essai et témoins, les dilutions testées et le nombre de cultures utilisées. Pour une explication plus détaillée, voir le texte du rapport.

NOMBRE DE DILUTIONS ET DE CULTURES POUR L'ETUDE D'EFFICACITÉ VIRUCIDE			
Groupe d'essai ou témoin	Dilutions testées (log₁₀)	Cultures par dilution	Nbre total de cultures
Témoin cellulaire	N/A	4	4/groupe
Témoin virus déshydraté (Groupe A)	-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7	4	28
Echantillon du lot n°1 + virus (Groupe B)	-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7	4	28
Echantillon du lot n°2 + virus (Groupe B)	-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7	4	28
Cytotoxicité du lot n°1 (Groupe C)	-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7	4	28
Cytotoxicité du lot n°2 (Groupe C)	-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7	4	28
Niveau non virucide – lot n°1 (Groupe D)	-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7	4	28
Niveau non virucide – lot n°2 (Groupe D)	-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7	4	28

METHODES

1. Préparation de la substance à l'essai
Deux lots de Sanosil S010 (Lot Z0905B8 et Lot Z2012B7) ont été utilisés purs, tels qu'envoyés par le promoteur. A l'emploi, la substance à l'essai était en solution comme déterminé par observation visuelle.
2. Préparation des films de virus
Les films de virus ont été préparés en étalant uniformément 0,2 ml d'inoculum viral sur le fond de trois boîtes de Pétri en verre, stériles, de 100 x 15 mm. Les films de virus ont été séchés à l'air libre à 20,0°C dans des conditions d'humidité relative de 50 %, jusqu'à ce qu'ils soient visiblement secs (20 minutes).
3. Filtration sur gel Sephadex
Afin de réduire le niveau de cytotoxicité du mélange virus-substance à l'essai avant le dosage du virus et/ou de réduire l'activité virucide de la substance à l'essai, le virus a été séparé de la substance à l'essai par filtration sur gel Sephadex. Des colonnes de Sephadex LH-20-100 ont été équilibrées avec une solution physiologique tamponnée au phosphate (tampon PBS) contenant 1 % d'albumine et centrifugées pendant trois minutes pour vider le volume mort. Les colonnes étaient alors prêtes à l'usage.

4. Traitement des films de virus par la substance à l'essai (GROUPE B, TABLEAU 1)
Pour chaque lot de substance à l'essai, un film de virus déshydraté a été individuellement exposé à une aliquote de 2,00 ml de la dilution de substance à l'essai, pendant 10 minutes à température ambiante (20,0°C). Les films de virus ont été entièrement recouverts de substance à l'essai. Après le temps d'exposition, les plaques ont été grattées une à une avec un grattoir à cellules pour remettre en suspension le contenu et le mélange virus-substance à l'essai a été immédiatement chromatographié sur colonne de Sephadex en utilisant le piston de la seringue pour détoxifier le mélange. Le filtrat (dilution 10^{-1}) a ensuite été titré après dilutions en série (au $1/10^{\text{ème}}$) en mesurant l'infectivité et/ou la cytotoxicité.
5. Traitement du film témoin de virus (GROUPE A, TABLEAU 1)
Un film de virus a été préparé comme décrit précédemment (paragraphe 2). Le film témoin a été exposé à une aliquote de 2,00 ml de milieu d'essai pendant le même temps d'exposition et à la même température d'exposition que les films d'essai exposés à la substance d'essai (dix minutes à 20,0°C). Après exposition, le témoin viral a été gratté avec un grattoir à cellules et le mélange viral a été immédiatement chromatographié sur colonne de Sephadex, de la même manière que pour le virus d'essai (paragraphe 4). Le filtrat (dilution 10^{-1}) a ensuite été titré après dilutions en série (10 en 10) en mesurant l'infectivité.
6. Témoin de cytotoxicité (GROUPE C, TABLEAU 2)
Une aliquote de 2,00 ml de la dilution utilisée de chaque lot de la substance à l'essai a été filtrée sur colonne de Sephadex et le filtrat a été dilué en série dans le milieu et inoculé dans des cultures de cellules RMK. La cytotoxicité des cellules RMK en culture a été notée en même temps que celle des cultures de virus-substance à l'essai et des cultures témoins.
7. Détermination du seuil non virucide de la substance à l'essai (GROUPE D, TABLEAU 3)
Chaque dilution de substance à l'essai filtrée sur Sephadex (témoin de cytotoxicité) a été mélangée avec une aliquote de solution-mère de virus à faible titre, et les mélanges obtenus ont fait l'objet d'un test d'infectivité et/ou de cytotoxicité afin de déterminer la (les) dilution(s) de substance à l'essai conservant une activité virucide, le cas échéant. Les dilutions qui présentaient une activité virucide n'ont pas été prises en compte pour déterminer la réduction de l'infectivité par la substance à l'essai.
8. Mesures de l'infectivité
La lignée cellulaire RMK, qui présente un ECP en présence du virus de la grippe A (H1N1), a été utilisée comme lignée cellulaire indicatrice dans les tests d'infectivité. Les cellules en boîtes de culture multipuits ont été inoculées, en quatre exemplaires, avec 0,1 ml des dilutions préparées à partir de tous les groupes d'essai et témoins. Les cultures de cellules indicatrices non infectées (témoins cellulaires) ont été inoculées avec le milieu d'essai seul. Les cultures ont été incubées à 36-38°C sous atmosphère humidifiée à 5-7 % de CO_2 , dans du matériel de laboratoire stérile à usage unique. Les cultures ont été évaluées périodiquement pendant six jours pour vérifier l'absence ou la présence d'un ECP, la cytotoxicité et la viabilité
9. Méthodes statistiques : Sans objet.

CHANGEMENTS DU PROTOCOLE

Amendements au protocole :

Aucun amendement n'a été requis pendant cette étude.

Ecarts au protocole :

Aucun écart au protocole n'a été observé pendant cette étude.

ANALYSE DES DONNEES

Calcul des titres

Les titres viraux et de cytotoxicité sont exprimés en $-\log_{10}$ de la mi-titration pour l'infectivité (TCID₅₀) ou la cytotoxicité (TCD₅₀), respectivement, calculées par la méthode de Spearman-Kärber.

$$-\text{Log de la 1ère dilution inoculée} - \left[\left(\frac{\text{Somme du pourcentage de mortalité à chaque dilution}}{100} \right) - 0.5 \right] \times (\text{logarithme de la dilution})$$

Calcul de la réduction logarithmique des titres

TCID₅₀ du virus déshydraté témoin – TCID₅₀ de la substance à l'essai = Réduction logarithmique

CRITERES D'ACCEPTATION

Les conditions suivantes étaient fixées pour que les tests soient valides : 1) qu'au moins 4 log₁₀ d'infectivité soient récupérés avec le film témoin de virus déshydraté; 2) que lorsqu'une cytotoxicité est visible, une réduction d'au moins 3 log du titre soit démontrée au-delà du seuil cytotoxique ; 3) que les témoins cellulaires soient négatifs au plan de l'infectivité. **Nota** : Pour être considéré comme efficace, un produit doit entraîner l'inactivation totale du virus à toutes les dilutions.

CONSERVATION

Conservation des dossiers

Toutes les données brutes originales extraites exclusivement de cette étude seront archivées chez ATS Labs, 1285 Corporate Center Drive, Suite 110, Eagan, MN 55121. Ces données originales sont notamment (liste non exhaustive) :

1. Toutes les données brutes manuscrites pour la substance à l'essai et les témoins, y compris, mais pas seulement, les cahiers de laboratoire, les fiches de données et les calculs.
2. Toutes les notifications d'amendement/d'écart au protocole.
3. Toutes les données mesurées utilisées pour formuler le rapport final.
4. Les mémorandums, spécifications et autre correspondance spécifique de l'étude concernant l'interprétation et l'évaluation des données, autres que les documents figurant dans le rapport d'étude final.
5. Le protocole original, signé.
6. Une copie certifiée conforme du rapport d'étude final.
7. Les écarts aux POS spécifiques de l'étude constatés pendant l'étude.

Conservation de la substance à l'essai

La substance à l'essai sera éliminée au terme de l'étude, selon le protocole validé par le promoteur. Il est de la responsabilité du promoteur de conserver un échantillon du produit à l'essai.

REFERENCES

1. Annual Book of ASTM Standards 2000, Section 11 Water and Environmental Technology Volume 11.05 Biological Effects and Environmental Fate: Biotechnology; Pesticides, E1053-97.
2. U.S. Environmental Protection Agency Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision G: Product Performance, 91-2(f), November 1982.
3. U.S. Environmental Protection Agency, Registration Division, Office of Pesticide Programs, DIS/TSS-7, November 12, 1981.
4. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections. Schmidt, N.J. and Emmons, R.W. editors. Sixth edition, 1989. p. 18-20.
5. Blackwell, J.H., and J.H.S. Chen. 1970. Effects of various germicidal chemicals on HEP-2 cell culture and Herpes simplex virus. J. AOAC 53:1229-1236.

RESULTATS DE L'ETUDE

Les Tableaux 1 à 3 présentent les résultats des tests effectués avec deux lots de Sanosil S010 (Lots Z0905B8 et Z2012B7), prêts à l'emploi, exposés au virus de la grippe A (H1N1) en présence de 1 % de sérum foetal bovin à température ambiante (20,0°C) pendant dix minutes. Tous les témoins cellulaires étaient négatifs pour l'infectivité du virus d'essai. Le titre du virus déshydraté témoin était de 4,75 log₁₀. Après exposition, on a noté une absence d'infectivité du virus d'essai dans le mélange virus-substance à l'essai, quels que soient le lot et la dilution testés.

Absence de cytotoxicité de la substance à l'essai, quels que soient le lot et la dilution testés ($\leq 0,5 \log_{10}$). Le contrôle de neutralisation (niveau non virucide de la substance à l'essai) montre que la substance à l'essai est neutralisée à un titre inférieur ou égal à 0,5 log₁₀ pour les deux lots. Compte tenu des résultats de cytotoxicité et du contrôle de neutralisation, la réduction du titre viral était supérieure ou égale à 4,25 log₁₀ pour les deux lots.

CONCLUSION DE L'ETUDE

Dans les conditions de cette étude et en présence de 1 % de sérum foetal bovin, le produit Sanosil S010 (Lots Z0905B8 et Z2012B7), prêt à l'emploi, entraîne une inactivation totale du virus de la grippe A (H1N1) après dix minutes d'exposition à température ambiante (20,0°C), répondant ainsi aux exigences de l'U.S. EPA pour l'homologation comme virucide.

Selon le Directeur d'Etude, aucune circonstance n'a entaché la qualité ou l'intégrité des données.

L'usage du nom, du logo ou de toute autre représentation d'ATS Labs est interdit sans l'autorisation écrite d'ATS Labs. Par ailleurs, ATS Labs ne peut être cité ou évoqué dans un quelconque document promotionnel, communiqué de presse, publicité ou matériel similaire (que ce soit sous forme écrite, orale ou électronique) sans l'autorisation écrite expresse d'ATS Labs.

TABLEAU 1 : Résultats pour le virus et le témoin

Effets de Sanosil S010 (Lots Z0905B8 et Z2012B7) après dix minutes d'exposition au virus déshydraté de la grippe A (H1N1) sur une surface inanimée

Dilution	Témoin Virus déshydraté (GROUPE A)	Virus de la grippe A (H1N1) + Lot Z0905B8 (GROUPE B)	Virus de la grippe A (H1N1) + Lot Z2012B7 (GROUPE B)
Témoin cellulaire	0000	0000	0000
10 ⁻¹	++++	0000	0000
10 ⁻²	++++	0000	0000
10 ⁻³	++++	0000	0000
10 ⁻⁴	++++	0000	0000
10 ⁻⁵	0000	0000	0000
10 ⁻⁶	000+	0000	0000
10 ⁻⁷	0000	0000	0000
TCID ₅₀ /0,1 ml	10 ^{4,75}	≤10 ^{0,5}	≤10 ^{0,5}

**TABLEAU 2: Résultats pour les témoins de cytotoxicité
Cytotoxicité de Sanosil S010 sur les cultures de cellules de rein
de singe Rhésus (RMK)**

Dilution	Témoin de cytotoxicité Lot Z0905B8 (GROUPE C)	Témoin de cytotoxicité Lot Z2012B7 (GROUPE C)
Témoin cellulaire	0000	0000
10 ⁻¹	0000	0000
10 ⁻²	0000	0000
10 ⁻³	0000	0000
10 ⁻⁴	0000	0000
10 ⁻⁵	0000	0000
10 ⁻⁶	0000	0000
10 ⁻⁷	0000	0000
TCID ₅₀ /0,1 ml	<10 ^{0,5}	≤10 ^{0,5}

(+) = Positif (présence du virus d'essai)

(0) = Absence de détection du virus d'essai et/ou absence de cytotoxicité

**TABLEAU 3: Résultats pour le contrôle de neutralisation
Niveau non virucide de la substance à l'essai (Contrôle de neutralisation)**

Dilution	Virus d'essai + Témoin de cytotoxicité Lot Z0905B8 (GROUPE D)	Virus d'essai + Témoin de cytotoxicité Lot Z2012B7 (GROUPE D)
Témoin cellulaire	0000	0000
10⁻¹	++++	++++
10⁻²	++++	++++
10⁻³	++++	++++
10⁻⁴	++++	++++
10⁻⁵	++++	++++
10⁻⁶	++++	++++
10⁻⁷	++++	++++

(+) = Positif (présence du virus d'essai) après addition de solution-mère de virus à faible titre (contrôle de neutralisation)

(0) = Absence de détection du virus d'essai et/ou absence de cytotoxicité

Les résultats du contrôle de niveau non virucide montrent que la substance à l'essai est neutralisée à une TCID₅₀ inférieure ou égale à 0,5 log₁₀ pour les deux lots.