

Le Directeur général

Maisons-Alfort, le 21 avril 2021

NOTE
d'appui scientifique et technique
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail

complémentaire à l'avis de l'Anses du 08 juin 2020

relatif à la stabilité et l'efficacité des désinfectants hydroalcooliques pour l'hygiène humaine tout au long de leur cycle de vie

L'Anses a été saisie le 19 mai 2020 par le Directeur général de la santé, la Directrice générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes et le Directeur général de la prévention des risques, pour la réalisation d'un appui scientifique et technique concernant les critères d'efficacité des désinfectants hydroalcooliques pour l'hygiène humaine des mains et la garantie de cette efficacité tout au long de leur cycle de vie.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA DEMANDE

La lutte contre la propagation du coronavirus SARS-CoV-2 a entraîné une augmentation importante de l'utilisation de produits désinfectants, en particulier des produits hydroalcooliques utilisés pour l'hygiène des mains, fortement mis en avant dans les recommandations sanitaires. Afin de prévenir toute pénurie de ces produits, le gouvernement a notamment facilité la production et la mise sur le marché des solutions et gels hydroalcooliques par des dispositions adaptées au titre du règlement sur les produits biocides, en accordant, par l'arrêté du 13 mars 2020 des dérogations pour certaines formulations dont les concentrations en alcool varient, selon la composition, de 65% à 80% v/v.

Ainsi, quatre formulations ont bénéficié du dispositif dérogatoire, deux formulations correspondant aux recommandations de l'Organisation mondiale de la santé et deux formulations proposées par les représentants de l'industrie cosmétique.

Dans ce contexte, il a été demandé à l'Anses d'apporter son expertise et ses recommandations sur les questions suivantes :

- Les critères d'efficacité virucide, et en particulier contre le virus SARS-CoV-2, des produits désinfectants pour l'hygiène humaine des mains au regard de la concentration

en substances actives et du respect de normes de référence, en particulier pour les produits à base d'alcool (éthanol, propan-1-ol et propan-2-ol).

- Les conditions de stockage, reconditionnement et utilisation pour garantir l'efficacité des produits et la maîtrise des risques à tous les stades de leurs cycles de vie.

Dans un avis du 08 juin 2020, l'Anses a apporté les éléments de réponses aux deux questions sur la base des informations à sa disposition.

Ainsi l'Anses a conclu qu'une efficacité virucide sur virus enveloppés, et donc *a priori* sur le SARS-CoV-2, est attendue dès lors que les solutions et gels hydroalcooliques désinfectants ont une teneur en alcool supérieure à 60% v/v. L'Anses rappelait néanmoins que les co-formulants peuvent avoir une influence sur l'efficacité de ces produits et sur le temps de contact nécessaire pour obtenir l'effet recherché. La démonstration de l'efficacité selon la norme EN 14476 constitue l'exigence réglementaire qui permet de garantir l'efficacité virucide de tout produit désinfectant destiné à l'hygiène des mains.

L'Anses a également émis un ensemble de recommandations générales relatives aux conditions de stockage, reconditionnement et utilisation, qui visent essentiellement à éviter l'évaporation de l'alcool au moment de l'ouverture des flacons et maîtriser la contamination microbienne des produits. Pour préciser ces recommandations générales, l'Anses a proposé un protocole expérimental visant à suivre, dans des conditions normales d'utilisation, l'évolution du titre alcoolique tout au long du cycle de vie de solutions ou gels hydroalcooliques désinfectants.

L'Anses a ensuite fait réaliser les travaux expérimentaux recommandés dans son avis :

- La mise en œuvre d'essais d'efficacité selon la norme EN 14476 sur des solutions et gels hydroalcooliques représentatifs des formulations autorisées par l'arrêté du 13 mars 2020.
- La mise en œuvre des essais de stabilité au stockage de solutions et gels hydroalcooliques dans les conditions représentatives de leur utilisation.

L'objet de cette note est de compléter l'avis du 8 juin 2020 en tenant compte des résultats de ces essais.

2. ORGANISATION DES TRAVAUX

Les produits testés sont représentatifs des quatre formulations autorisées par dérogation. Ils ont été, soit directement achetés dans le commerce par l'Anses, soit fournis comme échantillons par les sociétés fabriquant des solutions et gels hydroalcooliques à titre dérogatoire.

- Les solutions hydroalcooliques selon les formulations 1 et 2, correspondent à des compositions fixes recommandées par l'OMS
- Les gels hydroalcooliques selon les formulations 3 et 4, correspondent aux formulations proposées par les représentants de l'industrie cosmétique et ont été choisis avec une teneur nominale en éthanol au minimum de la gamme autorisée, soit 65% v/v.

Les essais d'efficacité virucide de quatre produits représentatifs ont été réalisés par le laboratoire Fonderephar, selon la norme EN 14476 + A2 (Juillet 2019). La teneur en éthanol et isopropanol (ou propan-2-ol) de chacune des formulations testées a été mesurée par le Service Commun des Laboratoires.

Les essais de stabilité ont été réalisés par le Service Commun des Laboratoires, dans le cadre d'une convention de partenariat scientifique. Deux formulations types ont été testées selon des scénarios d'utilisation prédéfinis : une solution à base d'éthanol correspondant à la formulation recommandée par l'OMS, et un gel à base d'éthanol à une teneur nominale de 65% v/v autorisée par dérogation.

Les rapports d'essais complets sont disponibles en annexe.

L'expertise a été conduite par la Direction d'évaluation des produits réglementés (DEPR) et présentée au comité d'experts spécialisé « substances et produits biocides » le 15 avril 2021.

L'Anses a analysé les liens d'intérêts déclarés. Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. RESULTATS

3.1. Efficacité virucide des solutions et gels hydroalcooliques

3.1.1. Démarche expérimentale

L'objectif des essais mis en œuvre selon la norme EN 14476 est de valider l'efficacité de solutions et gels hydroalcooliques vis-à-vis d'une revendication « virus enveloppés » et vis-à-vis d'une revendication spécifique « Coronavirus ».

Pour le traitement hygiénique des mains par friction, les conditions d'essai sont les suivantes : température d'essai de 20°C ± 1°C, temps de contact de 30s ± 5s, substance interférente simulant des conditions de propreté (0,3 g/L de solution d'albumine bovine).

Le critère d'efficacité est une réduction logarithmique détectable égale ou supérieure à 4.

Les produits ont été testés sur la souche du virus de la vaccine (ATCC VR-1508), souche modèle représentative des virus enveloppés, et la souche Coronavirus 229E (ATCC VR-740).

La norme prévoit que les produits testés soient soumis à essai à une concentration maximale de 80% car l'ajout des microorganismes d'essai et de la substance interférente s'accompagne forcément d'une dilution. Avec une méthode modifiée, il est néanmoins possible de réduire cette dilution et de tester le produit très peu dilué (uniquement à 97%), soit presque « prêt-à-l'emploi »

Ainsi, compte-tenu des concentrations en alcool des solutions et gels hydroalcooliques testées:

- Les quatre produits ont été testés à la dilution 80% v/v, dilution par défaut de la norme.
- Les produits 3 et 4 (gels) ont été testés à 97% v/v avec la méthode modifiée pour tenir compte de la concentration en alcool plus faible.
- Les produits 1 et 2 ont été testés à des dilutions adaptées (respectivement 65 % et 70% v/v) pour les comparer aux dilutions 80% v/v des produits 3 et 4.

L'ensemble des dilutions testées est résumé dans le Tableau 1 ci-dessous.

Formule testée / Teneur nominale dans le produit	Dilution 80% v/v (protocole standard)	dilution 97% v/v « prêt-à-l'emploi »	Dilution adaptée
Teneur nominale en alcool dans la dilution testée			
Produit 1 (solution) 80% v/v éthanol	64 % éthanol		52 % éthanol
Produit 2 (solution) 75% v/v isopropanol	60 % isopropanol		52 % isopropanol
Produit 3 (gel) 65 % v/v éthanol	52 % éthanol	63 % éthanol	
Produit 4 (gel) 65 % v/v éthanol	52 % éthanol	63 % éthanol	

Tableau 1 : Dilutions testées pour chacun des quatre produits et teneur nominale (déclarée) en alcool dans les dilutions.

La teneur en éthanol et isopropanol des formulations testées a été analysée par le Service Commun des Laboratoires, lors de la mise en œuvre des essais d'efficacité. La quantification de l'éthanol et de l'isopropanol a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à ionisation de flamme (CPG-DIF).

3.1.2. Résultats

- Titrage en alcool des formulations testées :

Les titres mesurés figurent dans le Tableau 2 ci-dessous.

	Produit 1 (solution)	Produit 2 (solution)	Produit 3 (gel)	Produit 4 (gel)
Déclaré	80% v/v éthanol	75% v/v isopropanol	65% v/v éthanol	65% v/v éthanol
Mesuré	78,2% v/v éthanol	76% v/v isopropanol	66,35 % v/v éthanol	61,4 % v/v éthanol

Tableau 2 : teneur en alcool déclarées et mesurées pour chacun des quatre produits

Les écarts entre les titrages mesurés et les teneurs nominales sont compris dans les variations tolérées par la réglementation sur les produits¹.

- Evaluation de l'efficacité virucide selon la norme EN 14476

L'ensemble des résultats figurent dans les rapports d'essais en annexe. Les critères de vérification de la méthodologie de la section 5.7 de la norme EN 14476 sont conformes.

Il est à noter que la norme prévoit généralement de tester trois dilutions pour chaque produit dont une ne permettant pas d'atteindre les critères d'efficacité. Dans le cas présent, chaque produit a été testé selon deux dilutions.

¹ Guidance on the Biocidal Products Regulation Volume I: Identity of the active substance/physico-chemical properties/analytical methodology – Information Requirements, Evaluation and Assessment. Parts A+B+C

L'efficacité sur virus enveloppés et sur la souche spécifique de Coronavirus pour l'ensemble des conditions testées est présentée dans le Tableau 3 ci-dessous.

	Produit 1 (solution) 80% v/v éthanol		Produit 2 (solution) 75% v/v isopropanol		Produit 3 (gel) 65% v/v éthanol		Produit 4 (gel) 65% v/v éthanol	
Dilutions testées	80% v/v (64% éthanol)	65% v/v (52% éthanol)	80% v/v (60% isopropanol)	70% v/v (52% isopropanol)	97% v/v (63% éthanol)	80% v/v (52% éthanol)	97% v/v (63% éthanol)	80% v/v (52% éthanol)
Red log Virus de la Vaccine	≥ 4	< 4	≥ 4	< 4	≥ 4	< 4	≥ 4	< 4
Red log Coronavirus 229E	≥ 4	< 4	≥ 4	< 4	≥ 4	< 4	≥ 4	< 4

Tableau 3 : efficacité des quatre produits testés aux différentes dilutions. L'efficacité est exprimée par l'abattement mesuré du titre viral en échelle logarithmique (Red Log) selon la norme EN 14476

Quel que soit le virus testé, virus de la vaccine ou Coronavirus 229E, la chute du titre viral obtenue suite à l'application des produits suit la même tendance (≥ 4 ou < 4 en fonction des concentrations en alcool), pour tous les produits testés. Le virus de la vaccine, souche modèle pour la revendication « virus enveloppés », est donc un modèle pertinent pour vérifier l'efficacité sur Coronavirus.

Les produits 1 et 2 (solutions) démontrent une efficacité virucide sur virus enveloppés et Coronavirus à la dilution 80% v/v (respectivement 64% éthanol et 60% isopropanol). A une dilution supérieure (équivalente à 52% d'éthanol ou d'isopropanol), ils ne sont plus suffisamment efficaces.

Les produits 3 et 4 (gels) démontrent une efficacité virucide sur virus enveloppés et Coronavirus, sans dilution (63% éthanol). A la dilution de 80% v/v (52% éthanol), ils ne sont plus suffisamment efficaces.

Les résultats complets sont présentés dans les rapports en annexe.

3.2. Stabilité des solutions et gels hydroalcooliques dans les conditions standard d'utilisation

3.2.1. Scénarios testés

Quatre scénarii ont été mis en œuvre pour tester la stabilité de la teneur en alcool d'une solution et d'un gel hydroalcoolique représentatif des formulations autorisées, dans le cadre de la dérogation de l'arrêté du 13 mars 2020 :

- Scénario n°1 « flacon de poche » : utilisation personnelle peu fréquente d'un petit flacon (100 mL) : prélèvement (3 mL) une fois par semaine pendant 5 mois.
- Scénario n°2 « bouteille pour un usage modéré » : flacon de 500 mL avec pompe doseuse. Ponction (3 mL) toutes les 2 heures pendant 8 à 10h, sur 3 semaines.

- Scénario n°3 « entrée de magasin » : usage intensif d'un flacon de 1L avec pompe doseuse. Ponction (3 mL) toutes les 5 minutes pendant 8 à 10h, sur 3 jours.
- Scénario 4 « Bidon de recharge » : ouverture journalière pendant 15 min d'un bidon de 5 L pour transvasement de 200 mL tous les jours, du lundi au vendredi, durant 5 semaines.

Ces essais ont été réalisés dans des conditions de stockage standard : température entre 15 et 26°C (moyenne 20°C), taux d'humidité entre 20 et 80%, conservation à l'abri de la lumière. La quantification de l'éthanol a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à ionisation de flamme (CPG-DIF).

3.2.2. Résultats

Les teneurs initiales en éthanol mesurées dans les solutions hydroalcooliques testées sont comprises entre 78 et 84% v/v. Les teneurs initiales en éthanol mesurées dans les gels hydroalcooliques testés, sont comprises entre 66 et 67% v/v. Ces teneurs sont proches des valeurs nominales.

Pour le scénario 1, 3 et 4, les teneurs en éthanol dans la solution comme dans les gels hydroalcooliques sont stables (variation de moins de 5% v/v) durant tout la durée de l'expérimentation.

Pour le scénario 2, une légère diminution de la teneur en éthanol est observée au cours du temps avec une baisse plus marquée pour la solution hydroalcoolique (près de 10% après 3 semaines) en comparaison avec le gel (environ 5% après 3 semaines). Toutefois, dans les deux essais, les concentrations en éthanol des gels ainsi que des solutions hydroalcooliques restent au-dessus de 60 % v/v.

Concernant les flacons avec pompe doseuse pour les scénarios 2 et 3, des analyses ont été réalisées quotidiennement sur le produit resté dans le corps de la pompe pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours (week-end), ainsi que sur le produit récupéré à la ponction suivante. Les essais montrent, quel que soit le scénario, que le produit resté dans le corps de la pompe toute une nuit ou tout un week-end présente la même teneur en éthanol que le produit présent dans le flacon.

Les résultats complets sont présentés dans le rapport en annexe.

4. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS DE L'ANSES

La lutte contre la propagation du coronavirus SARS-CoV-2 a entraîné une augmentation importante de l'utilisation de produits hydroalcooliques utilisés pour l'hygiène des mains, fortement mis en avant dans les recommandations sanitaires. Afin de prévenir toute pénurie de ces produits, le gouvernement a notamment facilité la production et la mise sur le marché des solutions et gels hydroalcooliques, par des dispositions adaptées au titre du règlement sur les produits biocides, en accordant, par l'arrêté du 13 mars 2020 des dérogations pour quatre formulations dont les concentrations en alcool varient selon la composition de 65% à 80% v/v.

Dans ce contexte, il a été demandé à l'Anses d'apporter son expertise et ses recommandations sur les questions suivantes :

- Les critères d'efficacité virucide, et en particulier contre le virus SARS-CoV-2, des produits désinfectants pour l'hygiène humaine des mains au regard de la concentration en substances actives et du respect de normes de référence, en particulier pour les produits à base d'alcool (éthanol, propan-1-ol et propan-2-ol).
- Les conditions de stockage, reconditionnement et utilisation pour garantir l'efficacité des produits et la maîtrise des risques à tous les stades de leurs cycles de vie.

Efficacité virucide

En se fondant sur les conclusions de l'OMS, de l'ANSM (anciennement AFSSAPS), de l'ECHA, ainsi que sur des données disponibles sur le registre européen des produits biocides, l'ANSES a indiqué dans son avis du 08 juin 2020 que :

- une efficacité validée sur virus enveloppés selon la norme EN14476 couvre à priori les virus de la famille des coronavirus, et en particulier le SARS-coV-2. Néanmoins, selon le document guide de l'ECHA², toute revendication sur une souche particulière doit faire l'objet d'un test dédié. Ainsi, selon ce guide, pour pouvoir revendiquer explicitement « efficace sur coronavirus », il faudrait prouver une efficacité sur virus enveloppés et tester un coronavirus représentatif.
- Une efficacité virucide sur virus enveloppés, et donc *a priori* sur le SARS-CoV-2, est attendue dès lors que les solutions ou gels hydroalcooliques ont une teneur en alcool supérieure à 60% v/v.

La démonstration de l'efficacité virucide selon la norme EN 14476 des quatre formulations autorisées par dérogation, après un contact de 30 secondes, a été confirmée par des essais expérimentaux réalisés sur virus enveloppés et sur une souche de coronavirus. Ces résultats confortent la nécessité de disposer de produits avec un titre nominal minimum de 65% v/v en éthanol ou isopropanol, afin de garantir une efficacité suffisante sur virus enveloppés, et donc sur coronavirus. Dès que la concentration en alcool diminue (résultats obtenus à une teneur de 52% v/v en éthanol ou isopropanol), l'efficacité vis-à-vis des virus enveloppés, et des coronavirus en particulier, est insuffisante.

Les formulations selon le protocole OMS (solutions hydroalcooliques), plus concentrées en alcool, présentent une garantie d'efficacité plus importante contre les éventuelles pertes en alcool lors du stockage et ou de l'utilisation puisqu'elles restent efficaces jusqu'à 20% de dégradation. Les formulations de type gels dont les concentrations en alcool peuvent être plus réduites présentent une garantie d'efficacité moins robuste contre les éventuelles pertes en alcool lors du stockage et ou de l'utilisation.

Stabilité et conditions de stockage

Dans son avis du 08 juin 2020, l'Anses a émis un ensemble de recommandations générales relatives aux conditions de stockage, reconditionnement et utilisation. L'éthanol et l'isopropanol sont des substances considérées comme très volatiles, il est donc important d'être vigilant sur les conditions de stockage des produits, en particulier une fois l'emballage ouvert. Aussi, les recommandations visent essentiellement à éviter l'évaporation de l'alcool au moment de l'ouverture des flacons pour garantir l'efficacité des produits et maîtriser la contamination microbienne de ceux-ci :

² Guidance on the Biocidal Products Regulation Volume II Efficacy - Assessment and Evaluation (Parts B+C) Version 3.0 April 2018

- pour les grands contenants : limiter le nombre de transvasements, la durée de stockage, conserver dans des endroits propres, effectuer les transvasements dans un endroit dont la température est inférieure à 20°C.
- Pour les solutions reconditionnées : nettoyer les bouteilles avant chaque remplissage. A minima, un nettoyage à l'eau et au savon devrait être préconisé, complété par une désinfection régulière ou une limitation du nombre de remplissages. En cas d'utilisation par des populations plus sensibles, une désinfection avec un désinfectant au spectre plus large devrait être fait, idéalement avant chaque remplissage.
- Dans le cas d'utilisation collective, ou pour des systèmes avec pompe doseuse, le volume de la bouteille doit être adapté à la consommation afin que le temps de séjour du produit dans la bouteille soit le plus limité.

De plus, les précautions d'emploi et d'étiquetage liées aux propriétés de danger des solutions et gels hydroalcooliques doivent être respectées.

L'Anses a ensuite engagé la mise en œuvre des essais visant à évaluer la stabilité de la teneur en éthanol de solutions et gels hydroalcooliques dans des conditions standardisées d'utilisation. **Ces essais montrent que la teneur en éthanol est stable lorsque les conditionnements peuvent être fermés entre deux usages (petite bouteille individuelle, ou bidons servant à la recharge).** Pour les bouteilles équipées d'une pompe doseuse, la teneur en éthanol reste stable lorsque que l'usage est intensif, et que le contenu de la bouteille est utilisé en quelques jours, mais elle est susceptible de diminuer lorsque la bouteille est utilisée sur plusieurs semaines, jusqu'à une teneur en éthanol potentiellement insuffisante pour garantir l'efficacité virucide du produit. Aussi, il convient d'adapter la taille des conditionnements à la consommation afin d'éviter l'utilisation sur plusieurs semaines de produits stockés dans des conditionnements ne pouvant être fermés entre deux utilisations.

L'Anses rappelle donc l'importance, dans le cadre de la pandémie de Covid-19, de n'utiliser que des solutions ou gels hydroalcooliques garantissant une teneur en alcool nominale d'au moins 65% v/v, de privilégier des conditionnements avec des bouchons hermétiques. Pour les bouteilles équipées de pompes doseuses, il est nécessaire de veiller à l'adéquation entre le volume et la fréquence d'utilisation pour que la durée d'utilisation du produit reste limitée . Les précautions d'emploi liées notamment aux propriétés de danger des solutions et gels hydroalcooliques doivent être observées.

Dr Roger Genet

MOTS-CLÉS

Solutions hydroalcooliques désinfectantes, gels hydroalcooliques, stockage, virucidie, SARS-CoV-2

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2021). Note d'appui scientifique et technique complémentaire à l'avis de l'Anses du 08 juin 2020 relatif à la stabilité et l'efficacité des désinfectants hydroalcooliques pour l'hygiène humaine tout au long de leur cycle de vie. (saisine 2020-SA-0067). Maisons-Alfort : Anses

ANNEXE 1 : SAISINE

2020-SA-0067



MINISTÈRE DES SOLIDARITÉS
ET DE LA SANTÉ

MINISTÈRE DE LA TRANSITION
ÉCOLOGIQUE ET SOLIDAIRE

Direction générale de la santé

Direction générale de la prévention des risques

MINISTÈRE DE L'ÉCONOMIE
ET DES FINANCES

Direction générale de la concurrence,
de la consommation et de la répression des fraudes

Paris, le 18 MAI 2020

Le Directeur général de la santé

Le Directeur général de la prévention des risques

La Directrice générale de la concurrence, de la
consommation et de la répression des fraudes

à

**Monsieur le Directeur général
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de
l'alimentation, de l'environnement et du
travail (Anses)**
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort cedex

Objet : Demande d'appui scientifique et technique concernant les critères d'efficacité des désinfectants hydroalcooliques pour l'hygiène humaine et la garantie de cette efficacité tout au long de leur cycle de vie

La lutte contre la propagation du coronavirus SARS-CoV-2 a entraîné une augmentation importante de l'utilisation de produits désinfectants, en particulier des produits hydroalcooliques utilisés pour l'hygiène des mains, fortement mis en avant dans les recommandations sanitaires. Afin de prévenir toute pénurie de ces produits, le gouvernement a facilité la production et la mise sur le marché des gels et solutions hydroalcooliques, notamment par des dispositions adaptées au titre du règlement sur les produits biocides, en accordant des dérogations pour certaines formulations, et en permettant un approvisionnement plus large en substances actives de l'ensemble des désinfectants au-delà des sources listées par l'agence européenne des produits chimiques.

Quatre formulations bénéficient du dispositif dérogatoire, qui se traduit en pratique par:

- Pour les trois formulations à base d'éthanol : une tolérance aux exigences du régime transitoire national (déclarations SIMMBAD et SYNAPSE, étiquetage complet),
- Pour la formulation à base d'isopropanol : une exemption à l'obligation de disposer d'une autorisation de mise sur le marché.

Deux formulations correspondent aux recommandations de l'Organisation mondiale de la santé. Elles sont également autorisées à la production par les pharmaciens (pharmacies d'officine, pharmacies à usage intérieur des établissements de santé, textes en cours de finalisation pour les facultés de pharmacie) par dérogation au code de la santé publique par arrêté du ministre en charge de la santé. Deux formulations ont été proposées par les représentants de l'industrie cosmétique.

Vos services ont été associés à la rédaction de ces arrêtés dérogatoires, comme prévu par le code de l'environnement.

La phase de déconfinement devrait maintenir un niveau de demande très important, sans doute en augmentation, en désinfectants d'hygiène humaine et de surface.

La disponibilité en contenants pour les désinfectants hydro-alcooliques a été identifiée comme un facteur limitant, et il convient donc de favoriser la réutilisation des contenants. Des pistes sont à l'étude comme le développement de la vente en vrac, déjà pratiquée par certaines pharmacies, et le recours aux reconditionnements les plus utiles et les plus sûrs.

Nous vous demandons d'apporter votre expertise et vos recommandations sur les questions suivantes :

- 1) **Les critères d'efficacité virucide, et en particulier contre le virus sars-cov-2, des produits désinfectants pour l'hygiène humaine** en matière de concentration en substances actives et de respect de normes de référence, en particulier pour les produits à base d'alcool (éthanol, propan-1-ol et propan-2-ol) :

Sur la base des différents avis scientifiques en particulier du Haut Conseil de la santé publique et de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé¹, et comme vous l'avez indiqué lors des travaux préparatoires aux arrêtés dérogatoires précités, il est estimé qu'un produit hydro alcoolique est efficace si le titre en alcool est supérieur à 60%. Cependant, divers avis récents ont formulé des recommandations différentes (70, 75%). Ces avis font tantôt référence au besoin de se conformer à la norme virucide EN 14476, tantôt présentent la concentration minimale en substance active comme une alternative au respect de la norme, suffisante pour garantir l'efficacité.

En raison des différents avis sur l'efficacité des produits hydroalcooliques en général, et notamment des formulations autorisées par les arrêtés dérogatoires, nous vous demandons également de tester l'efficacité de quatre formulations dérogatoires selon la norme EN 14476 sur virus enveloppés et/ou sur toute autre souche virale jugée pertinente pour évaluer une efficacité contre le SARS-CoV-2.

- 2) **Les conditions de stockage, reconditionnement et utilisation pour garantir l'efficacité des produits et la maîtrise des risques à tous les stades de leurs cycles de vie :**

Ces recommandations porteront en particulier sur l'impact de l'évaporation de l'alcool lors des phases d'ouverture des contenants, de reconditionnement ou d'utilisation et sur les pratiques à privilégier pour assurer une concentration minimale suffisante pour garantir l'efficacité des produits, en lien avec vos recommandations issues du point 1). Une attention particulière sera portée au cas de la vente en vrac et de la réutilisation de contenants.

1

https://www.ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/61e214a666eb691596a04b75393bcb29.pdf
<https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=811>
<https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=806>
<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/guidelines-use-non-pharmaceutical-measures-delay-and-mitigate-impact-2019-ncov>
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/community/election-polling-locations.html>

Vous formulerez également des recommandations pour maîtriser la contamination microbienne des produits lors du stockage de grands conditionnements et lors des phases de remplissage des conditionnements réutilisés.

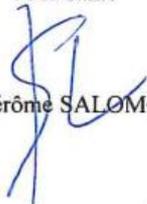
Afin de préciser les recommandations sur les conditions de stockage et d'utilisation des produits, vous proposerez un protocole permettant de suivre, dans des conditions normales d'utilisation, l'évolution du titre alcoolique tout au long du cycle de vie d'un produit. Vous mettrez ensuite en œuvre ce protocole et, le cas échéant, vous vous appuyerez sur les résultats obtenus pour préciser les recommandations formulées.

L'ensemble de ces recommandations seront rendues publiques sur votre site internet.

Compte tenu de l'urgence associée à la situation actuelle, votre réponse à la présente demande est attendue dans un délai de trois semaines. La mise en œuvre des tests d'efficacité des formulations dérogatoires selon la norme EN 14476 et la mise en œuvre du protocole de suivi du titrage alcoolique pourront être communiqués ultérieurement et faire l'objet de rapports séparés.

Le Directeur général
de la santé

Pr. Jérôme SALOMON



Le Directeur général
de la prévention des risques

Cédric BOURILLET



La Directrice générale de la concurrence,
de la consommation et de la répression des fraudes



Virginie BEAUMEUNIER

ANNEXE 2 : RAPPORTS D'ESSAIS D'EFFICACITE

Study 20-2782 - Test Report N°21-1656



Toulouse, March 10th 2021

**STUDY 20-2782
REPORT N°21-1656**

**DETERMINATION OF VIRICIDAL ACTIVITY
OF CHEMICAL ANTISEPTICS AND DISINFECTANTS
USED IN HUMAN MEDICINE BY THE METHODOLOGY OF THE
STANDARD NF EN 14476+A2 (JULY 2019)
HYGIENIC HAND FRICTION
VACCINE VIRUS
CLEAN CONDITION**

Promotor of Study ANSES
DEPR
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS-ALFORT - FRANCE

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

Dr. Laïla HADDIOUI
Assay Manager

Dr. Jocelyne BACARIA
Quality Manager

1/7

Study 20-2782 - Test Report N°21-1656

I - IDENTIFICATION OF TESTING LABORATORY

FONDEREPHAR

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

II - SAMPLE IDENTIFICATION

- Product name Product 1
- Batch number L202316001D
- Active Substance 80% V/V Ethanol

- Receipt date October/26/2020
- Internal code 20-2782-1

- Period of testing February - March 2021
- Supplier ANSES

- Storage conditions during period of testing: Ambient temperature in the dark

- Product appearance: Clear product

Study 20-2782 - Test Report N°21-1656

III- TEST METHOD

III-1 test Virus:

Name: Vaccine virus
Origin: ATCC
Reference: VR-1508
Supplier batch number: 5016818
Internal batch number: SS-1-110520 (Passage N°1) and SP-040216 (Passage N°1)

III-2 Recipient cells

Name: BHK-21
Origin: ECACC
Reference: 85011433
Supplier batch number: 09I007
Internal batch number: MCB-141215 (Passages N°31 and N°35)

IV - EXPERIMENTAL CONDITIONS

IV-1 Analysis conditions

- Concentrations test: 80% (V/V) and 65% (V/V)
- Contact time: 30 seconds \pm 5 s
- Test temperature: 20°C \pm 1°C
- Incubation temperature: 36°C \pm 1°C
- Product diluent: Water for injectables preparations
(Batch N°19MKA300)
- Interfering substance: BSA 0.3 g/l (Batch N°367 standard method)
- Culture medium: MEM (Batches N°2762 and N°2776)
- Molecular sieve filter: Sephadex LH20 (Batches N°10141 and
N°10170)
- Reference substance: Formaldehyde (Batch N°9672)
- Saline phosphate buffer (PBS) Batch N°MS00IO
- Dilutions product appearance Homogeneous solution

Study 20-2782 - Test Report N°21-1656

-**Stability and appearance of the test mixture during the test:** Preparation homogeneous during the test.

IV-2 Method

IV-2-1 Virus suspension title

The assay was performed by the microplate method of suspension cells. The cytopathic effect was determined at least 4 days of culture.

The number of infectious units is estimated by the SPEARMAN-KÄRBER method by calculating the negative logarithm of the 50% limit point (IgDICT₅₀) using the following formula:

$$\text{IgDICT}_{50} = \text{Negative logarithm of the highest concentration of virus used} - \left[\left(\frac{\text{Sum of \% assigned to each dilution}}{100} - 0.5 \right) \times (\text{lg of dilution}) \right]$$

IV-2-2 Cytotoxicity of product solutions

IV-2-2-1 Direct cytotoxicity

This test determines the concentration of disinfectant that does not induce signs of cytotoxicity to the cell line for the demonstration of the effect of virus.

IV-2-2-2 Indirect Cytotoxicity: molecular sievfilter

The activity of the product is stopped by the molecular sieving method using a sieve filter, i.e. Sephadex LH 20.

The neutralization of the formaldehyde is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/20.

The neutralization of the product test is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/10.

IV-2-3 Sensitivity of cells to viruses

Comparative assays were performed on cells treated or not with the disinfectant to ensure that the disinfectant subcytotoxic concentration does not change the behavior of the virus to receive cell.

IV-2-4 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

Immediately after preparation of the test mixture at time 0, the reaction was stopped in ice for 30 min ± 10 s and then infectious virus titre was determined.

IV-2-5 Reference virus inactivation

Virucidal effect of formaldehyde is tested to control the uniformity of the behavior of virus to chemical agents over time (5 min and 15 min).

V- RESULTS

Study 20-2782 - Test Report N°21-1656

V-1 Validation

V-1-1 Title of virus suspension

lg DICT₅₀ = 8.50

V-1-2 Cytotoxicity of product solutions

V-1-2-1-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 8.0 10⁻⁵ % (V/V)

V-1-2-1-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 0.08 % (V/V)

V-1-3 Sensitivity of cell to virus

S1 (in presence of product): lg DICT₅₀ = 8.13

S2 (in absence of product): lg DICT₅₀ = 8.50

S2 - S1 = 0.37

Sensitivity valid (limit S2 - S1 < 1 lg)

V-2 Assay

V-2-1 Validations

V-2-1-1 Title of virus suspension

lg DICT₅₀ = 8.25

V-2-1-2 Verification of control virus suspension assay in presence or absence of Sephadex

- Before Sephadex

lg DICT₅₀ = 7.75

- After Sephadex

lg DICT₅₀ = 7.50

Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-3 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

I1 (in presence of product): lg DICT₅₀ = 8.13

I2 (in absence of product): lg DICT₅₀ = 8.00

Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

Study 20-2782 - Test Report N°21-1656

V-2-1-4 Reference virus inactivation

V-2-1-4-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from $7.0 \cdot 10^{-6}\%$ (V/V)

V-2-1-4-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from $3.50 \cdot 10^{-4}\%$ (V/V)

V-2-1-4-3 Control virus suspension assay PBS

Before Sephadex

lg DICT₅₀ PBS = 7.50

After Sephadex

lg DICT₅₀ PBS = 7.00

Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-4-4 Results of formaldehyde

Contact time	5 min	15 min
lg DICT ₅₀	4.63	3.75
Logarithmic reduction	2.37	3.25

Study 20-2782 - Test Report N°21-1656

V-2-2 Result of assay product:

Vaccine virus - 30S ± 5S - 20°C ± 1°C						
-log Dilution	In presence of dilutions of test product				Contrôle	
	Degree of cytopathogenic effect*		% positive wells		Degree of cytopathog enic effect *	% positive wells
	80% (V/V)	65% (V/V)	80% (V/V)	65% (V/V)		
1	44444444	44444444	100	100%	44444444	100%
2	44444444	44444444	100%	100%	44444444	100%
3	44444444	44444444	100%	100%	44444444	100%
4	00000000	44444444	0%	100%	44444444	100%
5	00000000	44444444	0%	100%	44444444	100%
6	00000000	00000044	0%	25%	44444444	100%
7	00000000	00000000	0%	0%	44444444	100%
8	00000000	00000000	0	0%	00000000	0%
9	00000000	00000000	0%	0%	00000000	0%
10	00000000	00000000	0%	0%	00000000	0%
Ig DICT ₅₀			3.50	5.75		7.50

* 1 to 4: Presence of virus, with cytopathogenic effect observed in cell wells
0: Absence of virus, with absence of cytopathogenic effect

V-2-3 Logarithmic reduction

Contact time	30 seconds ± 5 S	
Concentrations	80% (V/V)	65% (V/V)
Lg réduction	4.00	1.75

VI - CONCLUSION

According to the standard NF EN 14476 +A2 (July 2019), the product 1 (Batch N°L202316001D) for the hygienic treatment of the hands by friction - in clean conditions - presents a virucidal activity at the assay concentration 80% (V/V) for the contact time 30 seconds ± 5 S against vaccine virus at 20°C ± 1°C.

These results hold only for the product under assay and apply to the sample as received.

Study 20-2782 - Test Report N°21-1660



Toulouse, March 12th 2021

**STUDY 20-2782
REPORT N°21-1660**

**DETERMINATION OF VIRICIDAL ACTIVITY
OF CHEMICAL ANTISEPTICS AND DISINFECTANTS
USED IN HUMAN MEDICINE OF THE STANDARD NF EN
14476+A2 (JULY 2019)
HYGIENIC HAND FRICTION
CORONAVIRUS 229 E (ADDITIONAL CONDITION)
CLEAN CONDITION**

Promotor of Study ANSES
DEPR
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS-ALFORT - FRANCE

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

Dr. Laïla HADDIOUI Assay Manager	Dr. Jocelyne BACARIA Quality Manager
-------------------------------------	---

1/7

Study 20-2782 - Test Report N°21-1660

I - IDENTIFICATION OF TESTING LABORATORY

FONDEREPHAR

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

II - SAMPLE IDENTIFICATION

- Product name Product 1
- Batch number L202316001D
- Active Substance 80% V/V Ethanol

- Receipt date October/26/2020
- Internal code 20-2782-1

- Period of testing March 2021
- Supplier ANSES

- Storage conditions during period of testing: Ambient temperature in the dark

- Product appearance: Clear product

Study 20-2782 - Test Report N°21-1660

III- TEST METHOD

III-1 test Virus:

- Name: Coronavirus 229E
- Origin: ATCC
- Designation: VR-740
- Number batch supplier: 58505270
- Internal batch number: SS-2-280520 (Batch N°2)

III-2 Recipient cells: Cellules VERO

- Origin: ATCC
- Designation: VERO cells
- ATCC reference: CCL-81
- ATCC number batch: 3372621
- Internal batch number: WCB-090708 (Batches N°44 and N°45)

IV - EXPERIMENTAL CONDITIONS

IV-1 Analysis conditions

- Concentrations test: 80% (V/V) and 65% (V/V)
- Contact time: 30 seconds \pm 5 s
- Test temperature: 20°C \pm 1°C
- Incubation temperature: 36°C \pm 1°C
- Product diluent: Water for injectables preparations (Batch N°19MKA300)
- Interfering substance: Standard method BSA 0.3g/l (Batch N°367)
- Culture medium: EMEM (Batches N°2761 and N°2784)
- Molecular sieve filter: Sephadex LH20 (Batches N°10141 and N°10170)
- Reference substance: Formaldehyde (Batches N°9672)
- Saline phosphate buffer (PBS): Batch N°MS00IO
- Dilutions product appearance: Homogeneous solution

Study 20-2782 - Test Report N°21-1660

-Stability and appearance of the test mixture during the test: Preparation homogeneous during the test.

IV-2 Method

IV-2-1 Virus suspension title

The assay was performed by the microplate method of suspension cells. The cytopathic effect was determined at least 4 days of culture.

The number of infectious units is estimated by the SPEARMAN-KÄRBER method by calculating the negative logarithm of the 50% limit point (IgDICT₅₀) using the following formula:

$$\text{IgDICT}_{50} = \text{Negative logarithm of the highest concentration of virus used} - \left[\frac{\text{Sum of \% assigned to each dilution}}{100 - 0.5} \times (\text{lg of dilution}) \right]$$

IV-2-2 Cytotoxicity of product solutions

IV-2-2-1 Direct cytotoxicity

This test determines the concentration of disinfectant that does not induce signs of cytotoxicity to the cell line for the demonstration of the effect of virus.

IV-2-2-2 Indirect Cytotoxicity: molecular sievfilter

The activity of the product is stopped by the molecular sieving method using a sieve filter, i.e. Sephadex LH 20.

The neutralization of the formaldehyde is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/20.

The neutralization of the product test is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/10.

IV-2-3 Sensitivity of cells to viruses

Comparative assays were performed on cells treated or not with the disinfectant to ensure that the disinfectant subcytotoxic concentration does not change the behavior of the virus to receive cell.

IV-2-4 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

Immediately after preparation of the test mixture at time 0, the reaction was stopped in ice for 30 min ± 10 s and then infectious virus titre was determined.

IV-2-5 Reference virus inactivation

Virucidal effect of formaldehyde is tested to control the uniformity of the behavior of virus to chemical agents over time (30 min and 60 min).

Study 20-2782 - Test Report N°21-1660

V- RESULTS

V-1 Validation

V-1-1 Cytotoxicity of product solutions

V-1-1-1-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from $8.00 \cdot 10^{-3}$ % (V/V)

V-1-1-1-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 0.80% (V/V)

V-1-2 Sensitivity of cell to virus

S1 (in presence of product): lg DICT₅₀ = 8.00

S2 (in absence of product): lg DICT₅₀ = 7.75

S2 - S1 = 0,25

Sensitivity valid (limit S2 - S1 < 1 lg)

V-2 Assay

V-2-1 Validations

V-2-1-1 Title of virus suspension

lg DICT₅₀ = 8.75

V-2-1-2 Verification of control virus suspension assay in presence or absence of Sephadex

- Before Sephadex

lg DICT₅₀ = 8.00

- After Sephadex

lg DICT₅₀ = 7.88

Difference ≤ 0,5 lg (verification valid)

V-2-1-3 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

I1 (in presence of product): lg DICT₅₀ = 8.38

I2 (in absence of product): lg DICT₅₀ = 8.38

Difference ≤ 0,5 lg (verification valid)

Study 20-2782 - Test Report N°21-1660

V-2-1-4 Reference virus inactivation

V-2-1-4-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 7.0 10⁻⁷% (V/V)

V-2-1-4-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 3.50 10⁻⁴% (V/V)

V-2-1-4-3 Control virus suspension assay PBS

Before Sephadex

lg DICT₅₀ PBS =7.88

After Sephadex

lg DICT₅₀ PBS =7.50

Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-4-4 Results of formaldehyde

Contact time	30 min	60 min
lg DICT ₅₀	3.63	3.13
Logarithmic reduction	3.87	4.37

Study 20-2782 - Test Report N°21-1660

V-2-2 Result of assay product:

Coronavirus 229 E - 30S ± 5S - 20°C ± 1°C						
-log Dilution	In presence of dilutions of test product				Contrôle	
	Degree of cytopathogenic effect*		% positive wells		Degree of cytopathog enic effect *	% positive wells
	80% (V/V)	65% (V/V)	80% (V/V)	65% (V/V)		
1	44444444	44444444	100	100	44444444	100%
2	44444444	44444444	100%	100%	44444444	100%
3	44444444	44444444	100%	100%	44444444	100%
4	44000000	44444444	25%	100%	44444444	100%
5	00000000	44444444	0%	100%	44444444	100%
6	00000000	44444444	0%	100%	44444444	100%
7	00000000	00000004	0%	12.5%	44444444	100%
8	00000000	00000000	0	0%	44400000	37.5%
9	00000000	00000000	0%	0%	00000000	0%
10	00000000	00000000	0%	0%	00000000	0%
lg DICT ₅₀			3.75	6.63		7.88

* 1 to 4: Presence of virus, with cytopathogenic effect observed in cell wells
0: Absence of virus, with absence of cytopathogenic effect

V-2-3 Logarithmic reduction

Contact time	30 seconds ± 5 S	
Concentrations	80% (V/V)	65% (V/V)
Lg réduction	4.13	1.25

VI - CONCLUSION

According to standard NF EN 14476 +A2 (July 2019), the product 1 - Batch N°L202316001D for the hygienic treatment of the hands by friction - in clean conditions - presents a virucidal activity at the assay concentration 80% (V/V) for the contact time 30 seconds ± 5 S against Coronavirus 229 E at 20°C ± 1°C.

These results hold only for the product under assay and apply to the sample as received.

Study 20-2782 - Test Report N°21-1659



Toulouse, March 12th 2021

**STUDY 20-2782
REPORT N°21-1659**

**DETERMINATION OF VIRICIDAL ACTIVITY
OF CHEMICAL ANTISEPTICS AND DISINFECTANTS
USED IN HUMAN MEDECINE OF THE STANDARD NF EN
14476+A2 (JULY 2019)
HYGIENIC HAND FRICTION
VACCINE VIRUS
CLEAN CONDITION**

Promotor of Study ANSES
DEPR
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS-ALFORT - FRANCE

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

Dr. Laïla HADDIOUI
Assay Manager

Dr. Jocelyne BACARIA
Quality Manager

1/7

Study 20-2782 - Test Report N°21-1659

I - IDENTIFICATION OF TESTING LABORATORY

FONDEREPHAR

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

II - SAMPLE IDENTIFICATION

- Product name Product 2
- Batch number 136 C4
- Active Substance 75% V/V Isopropanol
- Receipt date October/26/2020
- Internal code 20-2782-2
- Period of testing February - March 2021
- Supplier ANSES
- Storage conditions during period of testing: Ambient temperature in the dark
- Product appearance: Clear product

Study 20-2782 - Test Report N°21-1659

III- TEST METHOD

III-1 test Virus:

Name: Vaccine virus
Origin: ATCC
Reference: VR-1508
Supplier batch number: 5016818
Internal batch number: SS-1-110520 (Passage N°1) and SP-040216 (Passage N°1)

III-2 Recipient cells

Name: BHK-21
Origin: ECACC
Reference: 85011433
Supplier batch number: 09I007
Internal batch number: MCB-141215 (Passages N°31 and N°38)

IV - EXPERIMENTAL CONDITIONS

IV-1 Analysis conditions

- Concentrations test: 80% (V/V) and 70% (V/V)
- Contact time: 30 seconds \pm 5 s
- Test temperature: 20°C \pm 1°C
- Incubation temperature: 36°C \pm 1°C
- Product diluent: Water for injectables preparations
(Batch N°19MKA300)
- Interfering substance: BSA 0.3 g/l (Batches N°367 and N°377 standard
method)
- Culture medium: GMEM (Batches N°2762 and N°2776)
- Molecular sieve filter: Sephadex LH20 (Batches N°10141 and
N°10105)
- Reference substance: Formaldehyde (Batch N°9672)
- Saline phosphate buffer (PBS) Batch N°MS00IO

Study 20-2782 - Test Report N°21-1659

- Dilutions product appearance Homogeneous solution

-Stability and appearance of the test mixture during the test: Preparation homogeneous during the test.

IV-2 Method

IV-2-1 Virus suspension title

The assay was performed by the microplate method of suspension cells. The cytopathic effect was determined at least 4 days of culture.

The number of infectious units is estimated by the SPEARMAN-KÄRBER method by calculating the negative logarithm of the 50% limit point (lgDICT₅₀) using the following formula:

$lgDICT_{50} = \text{Negative logarithm of the highest concentration of virus used} - [(Sum of \% \text{ assigned to each dilution}/100 - 0.5) \times (lg \text{ of dilution})]$

IV-2-2 Cytotoxicity of product solutions

IV-2-2-1 Direct cytotoxicity

This test determines the concentration of disinfectant that does not induce signs of cytotoxicity to the cell line for the demonstration of the effect of virus.

IV-2-2-2 Indirect Cytotoxicity: molecular sievfilter

The activity of the product is stopped by the molecular sieving method using a sieve filter, i.e. Sephadex LH 20.

The neutralization of the formaldehyde is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/20.

The neutralization of the product test is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/10.

IV-2-3 Sensitivity of cells to viruses

Comparative assays were performed on cells treated or not with the disinfectant to ensure that the disinfectant subcytotoxic concentration does not change the behavior of the virus to receive cell.

IV-2-4 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

Immediately after preparation of the test mixture at time 0, the reaction was stopped in ice for 30 min ± 10 s and then infectious virus titre was determined.

IV-2-5 Reference virus inactivation

Virucidal effect of formaldehyde is tested to control the uniformity of the behavior of virus to chemical agents over time (5 min and 15 min).

FONDEREPHAR

Faculté des Sciences Pharmaceutiques - 35 Chemin des Maraîchers - 31062 TOULOUSE Cedex 09
Tél. 05 62 25 68 60 Fax. 05 61 25 95 72 Email. contact@fonderephar.com

4/7

Study 20-2782 - Test Report N°21-1659

V- RESULTS

V-1 Validation

V-1-1 Title of virus suspension

Ig DICT₅₀ = 8.13

V-1-2 Cytotoxicity of product solutions

V-1-2-1-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 8.00 10⁻⁶ % (V/V)

V-1-2-1-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 0.08% (V/V)

V-1-3 Sensitivity of cell to virus

S1 (in presence of product): Ig DICT₅₀ = 8.00

S2 (in absence of product): Ig DICT₅₀ = 8.50

S2 - S1 = 0.5

Sensitivity valid (limit S2 - S1 < 1 lg)

V-2 Assay

V-2-1 Validations

V-2-1-1 Title of virus suspension

Ig DICT₅₀ = 8.63

V-2-1-2 Verification of control virus suspension assay in presence or absence of Sephadex

- Before Sephadex

Ig DICT₅₀ = 7.63

- After Sephadex

Ig DICT₅₀ = 8.00

Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

Study 20-2782 - Test Report N°21-1659

V-2-1-3 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

I1 (in presence of product): lg DICT₅₀ = 8.63

I2 (in absence of product): lg DICT₅₀ = 8.25

Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-4 Reference virus inactivation

V-2-1-4-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 7.0 10⁻⁶% (V/V)

V-2-1-4-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 3.50 10⁻⁴% (V/V)

V-2-1-4-3 Control virus suspension assay PBS

Before Sephadex

lg DICT₅₀ PBS = 8.00

After Sephadex

lg DICT₅₀ PBS = 7.88

Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-4-4 Results of formaldehyde

Contact time	5 min	15 min
lg DICT ₅₀	5.38	3.88
Logarithmic reduction	2.50	3.00

FONDEREPHAR

Faculté des Sciences Pharmaceutiques - 35 Chemin des Maraîchers - 31062 TOULOUSE Cedex 09
Tél. 05 62 25 68 60 Fax. 05 61 25 95 72 Email. contact@fonderephar.com

6/7

Study 20-2782 - Test Report N°21-1659

V-2-2 Result of assay product:

Vaccine virus - 30S ± 5S - 20°C ± 1°C						
-log Dilution	In presence of dilutions of test product				Contrôle	
	Degree of cytopathogenic effect*		% positive wells		Degree of cytopathog enic effect *	% positive wells
	80% (V/V)	70% (V/V)	80% (V/V)	70% (V/V)		
1	44444444	44444444	100	100	44444444	100%
2	44444444	44444444	100%	100%	44444444	100%
3	44444444	44444444	100%	100%	44444444	100%
4	00440004	44444444	37.5%	100%	44444444	100%
5	00000000	44444404	0%	87.5%	44444444	100%
6	00000000	00000004	0%	12.5%	44444444	100%
7	00000000	00000000	0%	0%	44444444	100%
8	00000000	00000000	0	0%	00444004	50%
9	00000000	00000000	0%	0%	00000000	0%
10	00000000	00000000	0%	0%	00000000	0%
Ig DICT ₅₀			3.88	5.50		8.00

* 1 to 4: Presence of virus, with cytopathogenic effect observed in cell wells

0: Absence of virus, with absence of cytopathogenic effect

V-2-3 Logarithmic reduction

Contact time	30 seconds ± 5 S	
Concentrations	80% (V/V)	70% (V/V)
Lg réduction	4.12	2.50

VI - CONCLUSION

According to standard NF EN 14476 +A2 (July 2019), the product 2 (Batch N°136 C4) for the hygienic treatment of the hands by friction - in clean conditions - presents a virucidal activity at the assay concentration 80% (V/V) for the contact time 30 seconds ± 5 S against vaccine virus at 20°C ± 1°C.

These results hold only for the product under assay and apply to the sample as received.

FONDEREPHAR
Faculté des Sciences Pharmaceutiques - 35 Chemin des Maraîchers - 31062 TOULOUSE Cedex 09
Tél. 05 62 25 68 60 Fax. 05 61 25 95 72 Email. contact@fonderephar.com

7/7

Study 20-2782 - Test Report N°21-1670



Toulouse, April 6th 2021

**STUDY 20-2782
REPORT N°21-1670**

**DETERMINATION OF VIRUCIDAL ACTIVITY
OF CHEMICAL ANTISEPTICS AND DISINFECTANTS
USED IN HUMAN MEDICINE BY THE STANDARD NF EN
14476+A2 (JULY 2019)
HYGIENIC HAND FRICTION
CORONAVIRUS 229 E (ADDITIONAL CONDITION)
CLEAN CONDITION**

Promotor of Study ANSES
DEPR
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS-ALFORT - FRANCE

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

Dr. Laïla HADDIOUI Assay Manager	Dr. Jocelyne BACARIA Quality Manager
-------------------------------------	---

1/7

Study 20-2782 - Test Report N°21-1670

I - IDENTIFICATION OF TESTING LABORATORY

FONDEREPHAR

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

II - SAMPLE IDENTIFICATION

- Product name Product 2
- Batch number 136 C4
- Active Substance 75% V/V Isopropanol

- Receipt date October/26/2020
- Internal code 20-2782-2

- Period of testing March 2021
- Supplier ANSES

- Storage conditions during period of testing: Ambient temperature in the dark

- Product appearance: Clear product

Study 20-2782 - Test Report N°21-1670

III- TEST METHOD

III-1 Test Virus:

- Name: Coronavirus 229E
- Origin: ATCC
- Designation: VR-740
- Number batch supplier: 58505270
- Internal batch number: SS-2-280520 (Batch N°2)

III-2 Recipient cells: Cellules VERO

- Origin: ATCC
- Designation: VERO cells
- ATCC reference: CCL-81
- ATCC number batch: 3372621
- Internal batch number: WCB-090708 (Batches N°24 and N°44)

IV - EXPERIMENTAL CONDITIONS

IV-1 Analysis conditions

- Concentrations test: 80% (V/V) and 70% (V/V)
- Contact time: 30 seconds \pm 5 s
- Test temperature: 20°C \pm 1°C
- Incubation temperature: 36°C \pm 1°C
- Product diluent: Water for injectables preparations (Batch N°19MKA300)
- Interfering substance: Standard method BSA 0.3g/l (Batches N°367 and N°377)
- Culture medium: EMEM (Batches N°2761 and N°2784)
- Molecular sieve filter: Sephadex LH20 (Batches N°10141 and N°10237)
- Reference substance: Formaldehyde (Batches N°9672)
- Saline phosphate buffer (PBS) Batch N°MS00IO

Study 20-2782 - Test Report N°21-1670

- Dilutions product appearance Homogeneous solution
- Stability and appearance of the test mixture during the test: Preparation homogeneous during the test.

IV-2 Method

IV-2-1 Virus suspension title

The assay was performed by the microplate method of suspension cells. The cytopathic effect was determined at least 4 days of culture.

The number of infectious units is estimated by the SPEARMAN-KÄRBER method by calculating the negative logarithm of the 50% limit point (lgDICT₅₀) using the following formula:

$\text{lgDICT}_{50} = \text{Negative logarithm of the highest concentration of virus used} - [(\text{Sum of \% assigned to each dilution}/100 - 0.5) \times (\text{lg of dilution})]$

IV-2-2 Cytotoxicity of product solutions

IV-2-2-1 Direct cytotoxicity

This test determines the concentration of disinfectant that does not induce signs of cytotoxicity to the cell line for the demonstration of the effect of virus.

IV-2-2-2 Indirect Cytotoxicity: molecular sievfilter

The activity of the product is stopped by the molecular sieving method using a sieve filter, i.e. Sephadex LH 20.

The neutralization of the formaldehyde is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/20.

The neutralization of the product test is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/10.

IV-2-3 Sensitivity of cells to viruses

Comparative assays were performed on cells treated or not with the disinfectant to ensure that the disinfectant subcytotoxic concentration does not change the behavior of the virus to receive cell.

IV-2-4 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

Immediately after preparation of the test mixture at time 0, the reaction was stopped in ice for 30 min ± 10 s and then infectious virus titre was determined.

IV-2-5 Reference virus inactivation

Virucidal effect of formaldehyde is tested to control the uniformity of the behavior of virus to chemical agents over time (30 min and 60 min).

FONDEREPHAR

Faculté des Sciences Pharmaceutiques - 35 Chemin des Maraîchers - 31062 TOULOUSE Cedex 09
Tél. 05 62 25 68 60 Fax. 05 61 25 95 72 Email. contact@fonderephar.com

4/7

Study 20-2782 - Test Report N°21-1670

V- RESULTS

V-1 Validation

V-1-1 Cytotoxicity of product solutions

V-1-1-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from $8.00 \cdot 10^{-3}$ % (V/V)

V-1-1-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 0.80% (V/V)

V-1-2 Sensitivity of cell to virus

S1 (in presence of product): $\lg \text{DICT}_{50} = 8.38$

S2 (in absence of product): $\lg \text{DICT}_{50} = 7.75$

$S2 - S1 = 0.63$

Sensitivity valid (limit $S2 - S1 < 1 \lg$)

V-2 Assay

V-2-1 Validations

V-2-1-1 Title of virus suspension

$\lg \text{DICT}_{50} = 9.1$

V-2-1-2 Verification of control virus suspension assay in presence or absence of Sephadex

- Before Sephadex

$\lg \text{DICT}_{50} = 8.13$

- After Sephadex

$\lg \text{DICT}_{50} = 8.00$

Difference $\leq 0.5 \lg$ (verification valid)

V-2-1-3 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

I1 (in presence of product): $\lg \text{DICT}_{50} = 7.88$

I2 (in absence of product): $\lg \text{DICT}_{50} = 7.88$

Difference $\leq 0.5 \lg$ (verification valid)

FONDEREPHAR

Faculté des Sciences Pharmaceutiques - 35 Chemin des Maraîchers - 31062 TOULOUSE Cedex 09
Tél. 05 62 25 68 60 Fax. 05 61 25 95 72 Email. contact@fonderephar.com

5/7

Study 20-2782 - Test Report N°21-1670

V-2-1-4 Reference virus inactivation

V-2-1-4-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from $7.0 \cdot 10^{-6}\%$ (V/V)

V-2-1-4-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from $3.50 \cdot 10^{-4}\%$ (V/V)

V-2-1-4-3 Control virus suspension assay PBS

Before Sephadex

lg DICT₅₀ PBS = 7.63

After Sephadex

lg DICT₅₀ PBS = 7.63

Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-4-4 Results of formaldehyde

Contact time	30 min	60 min
lg DICT ₅₀	4.38	3.00
Logarithmic reduction	3.25	4.63

Study 20-2782 - Test Report N°21-1670

V-2-2 Result of assay product:

Coronavirus 229 E - 30S ± 5S - 20°C ± 1°C						
-log Dilution	In presence of dilutions of test product				Contrôle	
	Degree of cytopathogenic effect*		% positive wells		Degree of cytopathogenic effect *	% positive wells
	80% (V/V)	70% (V/V)	80% (V/V)	70% (V/V)		
1	44444444	44444444	100	100	44444444	100%
2	44444444	44444444	100%	100%	44444444	100%
3	44444000	44444444	62.5%	100%	44444444	100%
4	00000000	44440004	0%	62.5%	44444444	100%
5	00000000	44400000	0%	37.5%	44444444	100%
6	00000000	00000000	0%	0%	44444444	100%
7	00000000	00000000	0%	0%	44444044	87.5%
8	00000000	00000000	0	0%	44000444	62.5%
9	00000000	00000000	0%	0%	00000000	0%
10	00000000	00000000	0%	0%	00000000	0%
lg DICT ₅₀			3.13	4.50		8.00

* 1 to 4: Presence of virus, with cytopathogenic effect observed in cell wells
0: Absence of virus, with absence of cytopathogenic effect

V-2-3 Logarithmic reduction

Contact time	30 seconds ± 5 S	
Concentrations	80% (V/V)	70% (V/V)
Lg réduction	4.87	3.50

VI - CONCLUSION

According to standard NF EN 14476 +A2 (July 2019), the product 2 - Batch N°136 C4 for the hygienic treatment of the hands by friction - in clean conditions - presents a virucidal activity at the assay concentration 80% (V/V) for the contact time 30 seconds ± 5 S against Coronavirus 229 E at 20°C ± 1°C.

These results hold only for the product under assay and apply to the sample as received.

FONDEREPHAR
Faculté des Sciences Pharmaceutiques - 35 Chemin des Maraîchers - 31062 TOULOUSE Cedex 09
Tél. 05 62 25 68 60 Fax. 05 61 25 95 72 Email. contact@fonderephar.com

7/7

Study 20-2782 - Test Report N°21-1651



Toulouse, February 24th 2021

**STUDY 20-2782
REPORT N°21-1651**

**DETERMINATION OF VIRICIDAL ACTIVITY
OF CHEMICAL ANTISEPTICS AND DISINFECTANTS
USED IN HUMAN MEDICINE BY THE METHODOLOGY OF THE
STANDARD NF EN 14476+A2 (JULY 2019)
HYGIENIC HAND FRICTION
VACCINE VIRUS
CLEAN CONDITION**

Promotor of Study ANSES
DEPR
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS-ALFORT - FRANCE

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

Dr. Laïla HADDIOUI Assay Manager	Dr. Jocelyne BACARIA Quality Manager
-------------------------------------	---

1/8

Study 20-2782 - Test Report N°21-1651

I - IDENTIFICATION OF TESTING LABORATORY

FONDEREPHAR

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

II - SAMPLE IDENTIFICATION

- Product name Product 3
- Batch number 20000842
- Active Substance 65% V/V Ethanol

- Receipt date October/26/2020
- Internal code 20-2782-3

- Period of testing January - February 2021
- Supplier ANSES

- Storage conditions during period of testing: Ambient temperature in the dark

- Product appearance: Clear product

Study 20-2782 - Test Report N°21-1651

III- TEST METHOD

III-1 test Virus:

Name: Vaccine virus
Origin: ATCC
Reference: VR-1508
Supplier batch number: 5016818
Internal batch number: SS-1-200420 (Passage N°1) and SP-040216 (Passage N°1)

III-2 Recipient cells

Name: BHK-21
Origin: ECACC
Reference: 85011433
Supplier batch number: 09I007
Internal batch number: MCB-141215 (Passages N°15 and N°28)

IV - EXPERIMENTAL CONDITIONS

IV-1 Analysis conditions

- Concentrations test: 97% (V/V) and 80% (V/V)
- Contact time: 30 seconds \pm 5 s
- Test temperature: 20°C \pm 1°C
- Incubation temperature: 36°C \pm 1°C
- Product diluent: Water for injectables preparations
(Batch N°19MKA300)
- Interfering substance: BSA 0.3 g/l (Batch N°367 standard method)
BSA 1.5 g/l (Batches N°365 and N°366 modified method)
- Culture medium: EMEM (Batches N°2739 and N°2762)
- Molecular sieve filter: Sephadex LH20 (Batches N°10044 and N°10105)
- Reference substance: Formaldehyde (Batch N°9672)
- Saline phosphate buffer (PBS) Batches N°MS00MY and N°MS00IO

Study 20-2782 - Test Report N°21-1651

- Dilutions product appearance Homogeneous solution

-Stability and appearance of the test mixture during the test: Preparation homogeneous during the test.

IV-2 Method

IV-2-1 Virus suspension title

The assay was performed by the microplate method of suspension cells. The cytopathic effect was determined at least 4 days of culture.

The number of infectious units is estimated by the SPEARMAN-KÄRBER method by calculating the negative logarithm of the 50% limit point (lgDICT₅₀) using the following formula:

$\text{lgDICT}_{50} = \text{Negative logarithm of the highest concentration of virus used} - [(\text{Sum of \% assigned to each dilution}/100 - 0.5) \times (\text{lg of dilution})]$

IV-2-2 Cytotoxicity of product solutions

IV-2-2-1 Direct cytotoxicity

This test determines the concentration of disinfectant that does not induce signs of cytotoxicity to the cell line for the demonstration of the effect of virus.

IV-2-2-2 Indirect Cytotoxicity: molecular sievfilter

The activity of the product is stopped by the molecular sieving method using a sieve filter, i.e. Sephadex LH 20.

The neutralization of the formaldehyde is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/20.

The neutralization of the product test is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/10.

IV-2-3 Sensitivity of cells to viruses

Comparative assays were performed on cells treated or not with the disinfectant to ensure that the disinfectant subcytotoxic concentration does not change the behavior of the virus to receive cell.

IV-2-4 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

Immediately after preparation of the test mixture at time 0, the reaction was stopped in ice for 30 min ± 10 s and then infectious virus titre was determined.

IV-2-5 Reference virus inactivation

Virucidal effect of formaldehyde is tested to control the uniformity of the behavior of virus to chemical agents over time (30 min and 60 min).

FONDEREPHAR

Faculté des Sciences Pharmaceutiques - 35 Chemin des Maraîchers - 31062 TOULOUSE Cedex 09
Tél. 05 62 25 68 60 Fax. 05 61 25 95 72 Email. contact@fonderephar.com

4/8

Study 20-2782 - Test Report N°21-1651

V- RESULTS

V-1 Validation

V-1-1 Title of virus suspension

lg DICT₅₀ = 8.10

V-1-2 Cytotoxicity of product solutions

V-1-2-1-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 9.70 10⁻⁶ % (V/V)

V-1-2-1-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 0.97% (V/V)

V-1-3 Sensitivity of cell to virus

S1 (in presence of product): lg DICT₅₀ = 8.13

S2 (in absence of product): lg DICT₅₀ = 8.25

S2 - S1 = 0.12

Sensitivity valid (limit S2 - S1 < 1 lg)

V-2 Assay

V-2-1 Validations

V-2-1-1 Title of virus suspension

lg DICT₅₀ = 9.0

V-2-1-2 Verification of control virus suspension assay in presence or absence of Sephadex

- Modified method

- Before Sephadex

lg DICT₅₀ = 6.50

- After Sephadex

lg DICT₅₀ = 6.88

Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

Study 20-2782 - Test Report N°21-1651

- Standard method

- Before Sephadex

lg DICT₅₀ = 7.50

- After Sephadex

lg DICT₅₀ = 7.50

Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-3 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

I1 (in presence of product): lg DICT₅₀ = 8.50

I2 (in absence of product): lg DICT₅₀ = 8.88

Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-4 Reference virus inactivation

V-2-1-4-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 7.0 10⁻⁷% (V/V)

V-2-1-4-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 3.50 10⁻⁴% (V/V)

V-2-1-4-3 Control virus suspension assay PBS

Before Sephadex

lg DICT₅₀ PBS = 7.50

After Sephadex

lg DICT₅₀ PBS = 7.25

Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-4-4 Results of formaldehyde

Contact time	5 min	15 min
lg DICT ₅₀	5.63	3.38
Logarithmic reduction	1.62	3.87

Study 20-2782 - Test Report N°21-1651

V-2-2 Result of assay product:

Vaccine virus - 30S ± 5S - 20°C ± 1°C				
-log Dilution	In presence of dilutions of test product		control	
	Degree of cytopathogen effect*	% positive wells	Degree of cytopathogenic effect *	% positive wells
	97%	97%		
1	44444444	100%	44444444	100%
2	00444444	75%	44444444	100%
3	00000000	0%	44444444	100%
4	00000000	0%	44444444	100%
5	00000000	0%	44444444	100%
6	00000000	0%	44444444	100%
7	00000000	0%	00000000	0%
8	00000000	0	00000000	0%
9	00000000	0%	00000000	0%
10	00000000	0%	00000000	0%
lg DICT ₅₀		2.25		6.50

* 1 to 4: Presence of virus, with cytopathogenic effect observed in cell wells
0: Absence of virus, with absence of cytopathogenic effect

Vaccine virus - 30S ± 5S - 20°C ± 1°C				
-log Dilution	In presence of dilutions of test product		control	
	Degree of cytopathogen effect*	% positive wells	Degree of cytopathogenic effect *	% positive wells
	80%	80%		
1	44444444	100%	44444444	100%
2	44444444	100%	44444444	100%
3	44444444	100%	44444444	100%
4	04444044	75%	44444444	100%
5	00000000	0%	44444444	100%
6	00000000	0%	44444444	100%
7	00000000	0%	44444444	100%
8	00000000	0%	00000000	0%
9	00000000	0%	00000000	0%
10	00000000	0%	00000000	0%
lg DICT ₅₀		4.25		7.50

* 1 to 4: Presence of virus, with cytopathogenic effect observed in cell wells
0: Absence of virus, with absence of cytopathogenic effect

V-2-3 Logarithmic reduction

Contact time	30 seconds \pm 5 S	
Concentrations	97% (V/V)	80% (V/V)
Lg réduction	4.25	3.25

VI - CONCLUSION

According to standard NF EN 14476 +A2 (July 2019), the product 3 for the hygienic treatment of the hands by friction - in clean conditions - presents a virucidal activity at the assay concentration 97% (V/V) for the contact time 30 seconds \pm 5 S against vaccine virus at 20°C \pm 1°C.

These results hold only for the product under assay and apply to the sample as received.



Study 20-2782 - Test Report N°21-1613M

Toulouse, February 1st 2021

**STUDY 20-2782
REPORT N°21-1613M**

This report supersedes the precedent one (January 14th 2021)

**DETERMINATION OF VIRICIDAL ACTIVITY
OF CHEMICAL ANTISEPTICS AND DISINFECTANTS
USED IN HUMAN MEDICINE BY THE METHODOLOGY OF THE
STANDARD NF EN 14476+A2 (JULY 2019)
HYGIENIC HAND FRICTION
CORONAVIRUS 229 E (ADDITIONAL CONDITION)
CLEAN CONDITION**

Promotor of Study ANSES
DEPR
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS-ALFORT - FRANCE

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

Dr. Laïla HADDIOUI
Assay Manager

Dr. Jocelyne BACARIA
Quality Manager

1/8

Study 20-2782 - Test Report N°21-1613M

I - IDENTIFICATION OF TESTING LABORATORY

FONDEREPHAR

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

II - SAMPLE IDENTIFICATION

- Product name Product 3
- Batch number Not informed
- Active Substance 65% V/V Ethanol

- Receipt date October/26/2020
- Internal code 20-2782-3

- Period of testing December 2020 - January 2021
- Supplier ANSES
- Storage conditions during period of testing: Ambient temperature in the dark
- Product appearance: Clear product

Study 20-2782 - Test Report N°21-1613M

III- TEST METHOD

III-1 test Virus:

- Name: Coronavirus E229
- Origin: ATCC
- Designation: VR-740
- Number batch supplier: 58505270
- Internal batch number: SS-2-280520 (Batch N°2)

III-2 Recipient cells: Cellules VERO

- Origin: ATCC
- Designation: VERO cells
- ATCC reference: CCL-81
- ATCC number batch: 3372621
- Internal batch number: WCB-090708 (Batches N°16 and N°21)

IV - EXPERIMENTAL CONDITIONS

IV-1 Analysis conditions

- Concentrations test: 97% (V/V) and 80% (V/V)
- Contact time: 30 seconds \pm 5 s
- Test temperature: 20°C \pm 1°C
- Incubation temperature: 36°C \pm 1°C
- Product diluent: Water for injectables preparations (Batch N°19MKA300)
- Interfering substance: BSA 0.3g/l (Batches N°359 and N°360)
- Culture medium: EMEM (Batch N°2714)
- Molecular sieve filter: Sephadex LH20 (Batch N°9972)
- Reference substance: Formaldehyde (Batches N°9672 and N°9979)
- Saline phosphate buffer (PBS) Batch N°MS00MY
- Dilutions product appearance Homogeneous solution

Study 20-2782 - Test Report N°21-1613M

-Stability and appearance of the test mixture during the test: Preparation homogeneous during the test.

IV-2 Method

IV-2-1 Virus suspension titre

The assay was performed by the microplate method of suspension cells. The cytopathic effect was determined at least 4 days of culture.

The number of infectious units is estimated by the SPEARMAN-KÄRBER method by calculating the negative logarithm of the 50% limit point (lgDICT₅₀) using the following formula:

$\text{lgDICT}_{50} = \text{Negative logarithm of the highest concentration of virus used} - [(\text{Sum of \% assigned to each dilution}/100 - 0.5) \times (\text{lg of dilution})]$

IV-2-2 Cytotoxicity of product solutions

IV-2-2-1 Direct cytotoxicity

This test determines the concentration of disinfectant that does not induce signs of cytotoxicity to the cell line for the demonstration of the effect of virus.

IV-2-2-2 Indirect Cytotoxicity: molecular sievfilter

The activity of the product is stopped by the molecular sieving method using a sieve filter, i.e. Sephadex LH 20.

The neutralization of the formaldehyde is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/20.

The neutralization of the product test is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/10.

IV-2-3 Sensitivity of cells to viruses

Comparative assays were performed on cells treated or not with the disinfectant to ensure that the disinfectant subcytotoxic concentration does not change the behavior of the virus to receive cell.

IV-2-4 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

Immediately after preparation of the test mixture at time 0, the reaction was stopped in ice for 30 min ± 10 s and then infectious virus titre was determined.

IV-2-5 Reference virus inactivation

Virucidal effect of formaldehyde is tested to control the uniformity of the behavior of virus to chemical agents over time (30 min and 60 min).

Study 20-2782 - Test Report N°21-1613M

V- RESULTS

V-1 Validation

V-1-1 Title of virus suspension

lg DICT₅₀ = 9.10

V-1-2 Cytotoxicity of product solutions

V-1-2-1-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 9.70 10⁻³ % (V/V)

V-1-2-1-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 9.70% (V/V)

V-1-3 Sensitivity of cell to virus

S1 (in presence of product): lg DICT₅₀ = 8.63

S2 (in absence of product): lg DICT₅₀ = 8.63

S2 - S1 = 0.0

Sensitivity valid (limit S2 - S1 < 1 lg)

V-2 Assay

V-2-1 Validations

V-2-1-1 Title of virus suspension

lg DICT₅₀ = 9.1

V-2-1-2 Verification of control virus suspension assay in presence or absence of Sephadex

- Modified method

- Before Sephadex

lg DICT₅₀ = 7.75

- After Sephadex

lg DICT₅₀ = 7.63

Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

Study 20-2782 - Test Report N°21-1613M

- **Standard method**
- Before Sephadex
lg DICT₅₀ = 7.88
- After Sephadex
lg DICT₅₀ = 8.25
Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-3 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

- I1 (in presence of product): lg DICT₅₀ = 7.75
- I2 (in absence of product): lg DICT₅₀ = 8.13
Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-4 Reference virus inactivation

V-2-1-4-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 7.0 10⁻⁷% (V/V)

V-2-1-4-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 3.50 10⁻⁴% (V/V)

V-2-1-4-3 Control virus suspension assay PBS

- Before Sephadex
lg DICT₅₀ PBS = 8.13
- After Sephadex
lg DICT₅₀ PBS = 8.38
Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-4-4 Results of formaldehyde

Contact time	30 min	60 min
lg DICT ₅₀	3.75	3.13
Logarithmic reduction	4.63	5.25

Study 20-2782 - Test Report N°21-1613M

V-2-2 Result of assay product:

Coronavirus 229E - 30S ± 5S - 20°C ± 1°C				
-log Dilution	In presence of dilutions of test product		control	
	Degree of cytopathogen effect*	% positive wells	Degree of cytopathogenic effect *	% positive wells
	97%	97%		
1	11111111	100	22222222	100%
2	11111111	100%	22222222	100%
3	11111111	100%	11111111	100%
4	00000000	0%	11111111	100%
5	00000000	0%	11111111	100%
6	00000000	0%	11111111	100%
7	00000000	0%	11101111	87.5%
8	00000000	0	00010000	12.5%
9	00000000	0%	00000000	0%
10	00000000	0%	00000000	0%
lg DICT ₅₀		3.50		7.63

* 1 to 4: Presence of virus, with cytopathogenic effect observed in cell wells
0: Absence of virus, with absence of cytopathogenic effect

Coronavirus 229E - 30S ± 5S - 20°C ± 1°C				
-log Dilution	In presence of dilutions of test product		control	
	Degree of cytopathogen effect*	% positive wells	Degree of cytopathogenic effect *	% positive wells
	80%	80%		
1	11111111	100%	22222222	100%
2	11111111	100%	22222222	100%
3	11111111	100%	11111111	100%
4	11111111	100%	11111111	100%
5	11100011	62.5%	11111111	100%
6	1110001	50%	11111111	100%
7	00000000	0%	11111111	100%
8	00000000	0%	11111100	75%
9	00000000	0%	00000000	0%
10	00000000	0%	00000000	0%
lg DICT ₅₀		5.63		8.25

* 1 to 4: Presence of virus, with cytopathogenic effect observed in cell wells
0: Absence of virus, with absence of cytopathogenic effect

Study 20-2782 - Test Report N°21-1613M

V-2-3 Logarithmic reduction

Contact time	30 seconds \pm 5 S	
Concentrations	97% (V/V)	80% (V/V)
Lg réduction	4.13	2.62

VI - CONCLUSION

According to standard NF EN 14476 +A2 (July 2019), the product 3 for the hygienic treatment of the hands by friction - in clean conditions - presents a virucidal activity at the assay concentration 97% (V/V) for the contact time 30 seconds \pm 5 S against Coronavirus 229 E at 20°C \pm 1°C.

These results hold only for the product under assay and apply to the sample as received.

Study 20-2782 - Test Report N°21-1652



Toulouse, March 2nd 2021

**STUDY 20-2782
REPORT N°21-1652**

**DETERMINATION OF VIRICIDAL ACTIVITY
OF CHEMICAL ANTISEPTICS AND DISINFECTANTS
USED IN HUMAN MEDICINE BY THE METHODOLOGY OF THE
STANDARD NF EN 14476+A2 (JULY 2019)
HYGIENIC HAND FRICTION
VACCINE VIRUS
CLEAN CONDITION**

Promotor of Study ANSES
DEPR
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS-ALFORT - FRANCE

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

Dr. Laïla HADDIOUI
Assay Manager

Dr. Jocelyne BACARIA
Quality Manager

1/8

Study 20-2782 - Test Report N°21-1652

I - IDENTIFICATION OF TESTING LABORATORY

FONDEREPHAR

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

II - SAMPLE IDENTIFICATION

- Product name Product 4
- Batch number CY01171002
- Active Substance 65% V/V Ethanol

- Receipt date October/26/2020
- Internal code 20-2782-4

- Period of testing January - February 2021
- Supplier ANSES
- Storage conditions during period of testing: Ambient temperature in the dark
- Product appearance: Clear product

Study 20-2782 - Test Report N°21-1652

III- TEST METHOD

III-1 test Virus:

Name: Vaccine virus
Origin: ATCC
Reference: VR-1508
Supplier batch number: 5016818
Internal batch number: SS-1-200420 (Passage N°1) and SP-1-040216 (Passage N°1)

III-2 Recipient cells

Name: BHK-21
Origin: ECACC
Reference: 85011433
Supplier batch number: 09I007
Internal batch number: MCB-141215 (Passages N°19 and N°31)

IV - EXPERIMENTAL CONDITIONS

IV-1 Analysis conditions

- Concentrations test: 97% (V/V) and 80% (V/V)
- Contact time: 30 seconds \pm 5 s
- Test temperature: 20°C \pm 1°C
- Incubation temperature: 36°C \pm 1°C
- Product diluent: Water for injectables preparations
(Batch N°19MKA300)
- Interfering substance: BSA 0.3 g/l (Batch N°367 standard method)
BSA 1.5 g/l (Batches N°365 and N°366 modified method)
- Culture medium: GMEM (Batches N°2739 and N°2776)
- Molecular sieve filter: Sephadex LH20 (Batches N°10044 and N°10141)
- Reference substance: Formaldehyde (Batch N°9672)
- Saline phosphate buffer (PBS) Batches N°MS00MY and N°MS00IO

Study 20-2782 - Test Report N°21-1652

- Dilutions product appearance Homogeneous solution

-Stability and appearance of the test mixture during the test: Preparation homogeneous during the test.

IV-2 Method

IV-2-1 Virus suspension title

The assay was performed by the microplate method of suspension cells. The cytopathic effect was determined at least 4 days of culture.

The number of infectious units is estimated by the SPEARMAN-KÄRBER method by calculating the negative logarithm of the 50% limit point (lgDICT₅₀) using the following formula:

$\text{lgDICT}_{50} = \text{Negative logarithm of the highest concentration of virus used} - [(\text{Sum of \% assigned to each dilution}/100 - 0.5) \times (\text{lg of dilution})]$

IV-2-2 Cytotoxicity of product solutions

IV-2-2-1 Direct cytotoxicity

This test determines the concentration of disinfectant that does not induce signs of cytotoxicity to the cell line for the demonstration of the effect of virus.

IV-2-2-2 Indirect Cytotoxicity: molecular sievfilter

The activity of the product is stopped by the molecular sieving method using a sieve filter, i.e. Sephadex LH 20.

The neutralization of the formaldehyde is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/20.

The neutralization of the product test is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/10.

IV-2-3 Sensitivity of cells to viruses

Comparative assays were performed on cells treated or not with the disinfectant to ensure that the disinfectant subcytotoxic concentration does not change the behavior of the virus to receive cell.

IV-2-4 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

Immediately after preparation of the test mixture at time 0, the reaction was stopped in ice for 30 min ± 10 s and then infectious virus titre was determined.

IV-2-5 Reference virus inactivation

Virucidal effect of formaldehyde is tested to control the uniformity of the behavior of virus to chemical agents over time (5 min and 15 min).

Study 20-2782 - Test Report N°21-1652

V- RESULTS

V-1 Validation

V-1-1 Title of virus suspension

lg DICT₅₀ = 8.10

V-1-2 Cytotoxicity of product solutions

V-1-2-1-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 9.70 10⁻⁶ % (V/V)

V-1-2-1-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 0.097% (V/V)

V-1-3 Sensitivity of cell to virus

S1 (in presence of product): lg DICT₅₀ = 7.75

S2 (in absence of product): lg DICT₅₀ = 8.50

S2 - S1 = 0.75

Sensitivity valid (limit S2 - S1 < 1 lg)

V-2 Assay

V-2-1 Validations

V-2-1-1 Title of virus suspension

lg DICT₅₀ = 9.0

V-2-1-2 Verification of control virus suspension assay in presence or absence of Sephadex

- Modified method

- Before Sephadex

lg DICT₅₀ = 7.25

- After Sephadex

lg DICT₅₀ = 7.38

Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

Study 20-2782 - Test Report N°21-1652

- **Standard method**
- Before Sephadex
lg DICT₅₀ = 7.63
- After Sephadex
lg DICT₅₀ = 7.75
- Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-3 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

- I1 (in presence of product): lg DICT₅₀ = 8.13
- I2 (in absence of product): lg DICT₅₀ = 8.25
- Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-4 Reference virus inactivation

V-2-1-4-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 7.0 10⁻⁷% (V/V)

V-2-1-4-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 3.50 10⁻⁴% (V/V)

V-2-1-4-3 Control virus suspension assay PBS

- Before Sephadex
lg DICT₅₀ PBS = 7.38
- After Sephadex
lg DICT₅₀ PBS = 7.25
- Difference ≤ 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-4-4 Results of formaldehyde

Contact time	5 min	15 min
lg DICT ₅₀	4.75	3.50
Logarithmic reduction	2.50	3.75

Study 20-2782 - Test Report N°21-1652

V-2-2 Result of assay product:

Vaccine virus - 30S ± 5S - 20°C ± 1°C				
-log Dilution	In presence of dilutions of test product		control	
	Degree of cytopathogen effect*	% positive wells	Degree of cytopathogenic effect *	% positive wells
	97%	97%		
1	44444444	100%	44444444	100%
2	44444444	100%	44444444	100%
3	44400000	37.5%	44444444	100%
4	00000000	0%	44444444	100%
5	00000000	0%	44444444	100%
6	00000000	0%	44444444	100%
7	00000000	0%	44444404	87.5%
8	00000000	0	00000000	0%
9	00000000	0%	00000000	0%
10	00000000	0%	00000000	0%
lg DICT ₅₀		2.88		7.38

* 1 to 4: Presence of virus, with cytopathogenic effect observed in cell wells
0: Absence of virus, with absence of cytopathogenic effect

Vaccine virus - 30S ± 5S - 20°C ± 1°C				
-log Dilution	In presence of dilutions of test product		control	
	Degree of cytopathogen effect*	% positive wells	Degree of cytopathogenic effect *	% positive wells
	80%	80%		
1	44444444	100%	44444444	100%
2	44444444	100%	44444444	100%
3	44444444	100%	44444444	100%
4	44444444	100%	44444444	100%
5	00000044	50%	44444444	100%
6	00000000	0%	44444444	100%
7	00000000	0%	44444444	100%
8	00000000	0%	00000444	37.5%
9	00000000	0%	00000000	0%
10	00000000	0%	00000000	0%
lg DICT ₅₀		4.75		7.75

* 1 to 4: Presence of virus, with cytopathogenic effect observed in cell wells
0: Absence of virus, with absence of cytopathogenic effect

Study 20-2782 - Test Report N°21-1652

V-2-3 Logarithmic reduction

Contact time	30 seconds \pm 5 S	
Concentrations	97% (V/V)	80% (V/V)
Lg réduction	4.50	3.00

VI - CONCLUSION

According to standard NF EN 14476 +A2 (July 2019), the product 4 (Batch N°CY01171002) for the hygienic treatment of the hands by friction - in clean conditions - presents a virucidal activity at the assay concentration 97% (V/V) for the contact time 30 seconds \pm 5 S against vaccine virus at 20°C \pm 1°C.

These results hold only for the product under assay and apply to the sample as received.

Study 20-2782 - Test Report N°21-1632



Toulouse, February 1st 2021

**STUDY 20-2782
REPORT N°21-1632**

**DETERMINATION OF VIRICIDAL ACTIVITY
OF CHEMICAL ANTISEPTICS AND DISINFECTANTS
USED IN HUMAN MEDICINE BY THE METHODOLOGY OF THE
STANDARD NF EN 14476+A2 (JULY 2019)
HYGIENIC HAND FRICTION
CORONAVIRUS 229 E (ADDITIONAL CONDITION)
CLEAN CONDITION**

Promotor of Study ANSES
DEPR
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS-ALFORT - FRANCE

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

Dr. Laïla HADDIOUI Assay Manager	Dr. Jocelyne BACARIA Quality Manager
-------------------------------------	---

1/8

Study 20-2782 - Test Report N°21-1632

I - IDENTIFICATION OF TESTING LABORATORY

FONDEREPHAR

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

II - SAMPLE IDENTIFICATION

- Product name Product 4
- Batch number CY0117 1002
- Active Substance 65% V/V Ethanol

- Receipt date October/26/2020
- Internal code 20-2782-4

- Period of testing December 2020 - January 2021
- Supplier ANSES
- Storage conditions during period of testing: Ambient temperature in the dark
- Product appearance: Clear product

Study 20-2782 - Test Report N°21-1632

III- TEST METHOD

III-1 test Virus:

- Name: Coronavirus 229E
- Origin: ATCC
- Designation: VR-740
- Number batch supplier: 58505270
- Internal batch number: SS-2-280520 (Batch N°2)

III-2 Recipient cells: Cellules VERO

- Origin: ATCC
- Designation: VERO cells
- ATCC reference: CCL-81
- ATCC number batch: 3372621
- Internal batch number: WCB-090708 (Batches N°17 and N°21)

IV - EXPERIMENTAL CONDITIONS

IV-1 Analysis conditions

- Concentrations test: 97% (V/V) and 80% (V/V)
- Contact time: 30 seconds \pm 5 s
- Test temperature: 20°C \pm 1°C
- Incubation temperature: 36°C \pm 1°C
- Product diluent: Water for injectables preparations (Batch N°19MKA300)
- Interfering substance: Standard method BSA 0.3g/l (Batch N°364)
Modified method BSA 1.5g/l (Batches N°360 et N°365)
- Culture medium: EMEM (Batches N°2714 and N°2735)
- Molecular sieve filter: Sephadex LH20 (Batches N°9972 and N°10044)
- Reference substance: Formaldehyde (Batches N°9672)
- Saline phosphate buffer (PBS) Batch N°MS00MY

Study 20-2782 - Test Report N°21-1632

- Dilutions product appearance Homogeneous solution
-Stability and appearance of the test mixture during the test: Preparation homogeneous during the test.

IV-2 Method

IV-2-1 Virus suspension title

The assay was performed by the microplate method of suspension cells. The cytopathic effect was determined at least 4 days of culture.

The number of infectious units is estimated by the SPEARMAN-KÄRBER method by calculating the negative logarithm of the 50% limit point (lgDICT₅₀) using the following formula:

$\text{lgDICT}_{50} = \text{Negative logarithm of the highest concentration of virus used} - [(\text{Sum of \% assigned to each dilution}/100 - 0.5) \times (\text{lg of dilution})]$

IV-2-2 Cytotoxicity of product solutions

IV-2-2-1 Direct cytotoxicity

This test determines the concentration of disinfectant that does not induce signs of cytotoxicity to the cell line for the demonstration of the effect of virus.

IV-2-2-2 Indirect Cytotoxicity: molecular sievfilter

The activity of the product is stopped by the molecular sieving method using a sieve filter, i.e. Sephadex LH 20.

The neutralization of the formaldehyde is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/20.

The neutralization of the product test is validated by passing it through Sephadex at a dilution 1/10.

IV-2-3 Sensitivity of cells to viruses

Comparative assays were performed on cells treated or not with the disinfectant to ensure that the disinfectant subcytotoxic concentration does not change the behavior of the virus to receive cell.

IV-2-4 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

Immediately after preparation of the test mixture at time 0, the reaction was stopped in ice for 30 min ± 10 s and then infectious virus titre was determined.

IV-2-5 Reference virus inactivation

Virucidal effect of formaldehyde is tested to control the uniformity of the behavior of virus to chemical agents over time (30 min and 60 min).

FONDEREPHAR

Faculté des Sciences Pharmaceutiques - 35 Chemin des Maraîchers - 31062 TOULOUSE Cedex 09
Tél. 05 62 25 68 60 Fax. 05 61 25 95 72 Email. contact@fonderephar.com

4/8

Study 20-2782 - Test Report N°21-1632

V- RESULTS

V-1 Validation

V-1-1 Cytotoxicity of product solutions

V-1-1-1-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from $9.70 \cdot 10^{-5}$ % (V/V)

V-1-1-1-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 0.097% (V/V)

V-1-2 Sensitivity of cell to virus

S1 (in presence of product): $\lg \text{DICT}_{50} = 8.38$

S2 (in absence of product): $\lg \text{DICT}_{50} = 8.25$

$S2 - S1 = 0.13$

Sensitivity valid (limit $S2 - S1 < 1 \lg$)

V-2 Assay

V-2-1 Validations

V-2-1-1 Title of virus suspension

$\lg \text{DICT}_{50} = 9.1$

V-2-1-2 Verification of control virus suspension assay in presence or absence of Sephadex

- Modified method

- Before Sephadex

$\lg \text{DICT}_{50} = 7.38$

- After Sephadex

$\lg \text{DICT}_{50} = 7.38$

Difference $\leq 0.5 \lg$ (verification valid)

Study 20-2782 - Test Report N°21-1632

- Standard method

- Before Sephadex

lg DICT₅₀ = 7.88

- After Sephadex

lg DICT₅₀ = 7.25

Difference \leq 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-3 Verification of effectiveness of stopping the disinfectant activity at T0

I1 (in presence of product): lg DICT₅₀ = 8.38

I2 (in absence of product): lg DICT₅₀ = 8.25

Difference \leq 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-4 Reference virus inactivation

V-2-1-4-1 Direct cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 7.0 10⁻⁷% (V/V)

V-2-1-4-2 Indirect cytotoxicity

No-cytotoxic concentration from 3.50 10⁻⁴% (V/V)

V-2-1-4-3 Control virus suspension assay PBS

Before Sephadex

lg DICT₅₀ PBS = 7.50

After Sephadex

lg DICT₅₀ PBS = 7.75

Difference \leq 0.5 lg (verification valid)

V-2-1-4-4 Results of formaldehyde

Contact time	30 min	60 min
lg DICT ₅₀	3.88	3.0
Logarithmic reduction	3.87	4.75

Study 20-2782 - Test Report N°21-1632

V-2-2 Result of assay product:

Coronavirus 229E - 30S ± 5S - 20°C ± 1°C				
-log Dilution	In presence of dilutions of test product		control	
	Degree of cytopathogen effect*	% positive wells	Degree of cytopathogenic effect *	% positive wells
	97%	97%		
1	44444444	100%	44444444	100%
2	44444444	100%	44444444	100%
3	00000044	25%	44444444	100%
4	00000000	0%	44444444	100%
5	00000000	0%	44444444	100%
6	00000000	0%	44444444	100%
7	00000000	0%	44444404	87.5%
8	00000000	0%	00000000	0%
9	00000000	0%	00000000	0%
10	00000000	0%	00000000	0%
lg DICT ₅₀		2.75		7.38

* 1 to 4: Presence of virus, with cytopathogenic effect observed in cell wells
0: Absence of virus, with absence of cytopathogenic effect

Coronavirus 229E - 30S ± 5S - 20°C ± 1°C				
-log Dilution	In presence of dilutions of test product		control	
	Degree of cytopathogen effect*	% positive wells	Degree of cytopathogenic effect *	% positive wells
	80%	80%		
1	44444444	100%	44444444	100%
2	44444444	100%	44444444	100%
3	44444444	100%	44444444	100%
4	40444444	87.5%	44444444	100%
5	00000444	37.5%	44444444	100%
6	00000000	0%	44444444	100%
7	00000000	0%	44444404	87.5%
8	00000000	0%	00000000	0%
9	00000000	0%	00000000	0%
10	00000000	0%	00000000	0%
lg DICT ₅₀		4.75		7.25

* 1 to 4: Presence of virus, with cytopathogenic effect observed in cell wells
0: Absence of virus, with absence of cytopathogenic effect

Study 20-2782 - Test Report N°21-1632

V-2-3 Logarithmic reduction

Contact time	30 seconds \pm 5 S	
Concentrations	97% (V/V)	80% (V/V)
Lg réduction	4.63	2.50

VI - CONCLUSION

According to standard NF EN 14476 +A2 (July 2019), the product 4 - Batch N°CY0117 1002 for the hygienic treatment of the hands by friction - in clean conditions - presents a virucidal activity at the assay concentration 97% (V/V) for the contact time 30 seconds \pm 5 S against Coronavirus 229 E at 20°C \pm 1°C.

These results hold only for the product under assay and apply to the sample as received.

ANNEXE 3 : RAPPORTS D'ESSAIS DE STABILITE

Rapport sur l'étude du vieillissement de produits hydro-alcooliques pour la désinfection des mains - Travail réalisé dans le cadre du protocole ANSES – SCL selon les modalités décrites dans la convention de coopération scientifique et de confidentialité

Résumé : L'étude de stabilité des solutions et gels hydro-alcooliques pour l'asepsie des mains réalisée sur sollicitation de l'ANSES s'est déroulée sur une période de cinq mois de septembre 2020 à février 2021 au SCL de Lyon. Le protocole analytique prédéfini pour illustrer la diversité des modes d'utilisation par le grand public, traduit par quatre scénarii reproduisant les fréquences d'utilisation, faible modérée ou intensive et une situation de recharge de petits contenants à partir de bidon de cinq litres, a permis d'étudier l'évolution de la teneur en alcool (éthanol) au fil du temps. Les résultats des analyses effectuées sur des formulations commerciales prêtes à l'emploi témoignent que l'évolution d'un gel est similaire à celui d'une solution quel que soit le scénario. L'étude des données tendent à montrer qu'un petit contenant favorise le maintien du taux d'alcool, même sur plusieurs mois après la première ouverture et jusqu'à vider le flacon. L'emploi d'une pompe manuelle plutôt qu'un bouchon étanche n'impacte pas la qualité du produit resté dans le corps de pompe. En revanche, les résultats indiquent un glissement de la teneur en alcool pour le scénario d'usage modéré associé à un flacon d'un demi-litre et pour le cas du bidon de 5L ouvert quotidiennement pour transvaser un volume de 200mL. Dans l'ensemble des situations étudiées, la teneur en alcool est restée au-dessus de 60%v/v, seuil au-dessus duquel la désinfection est considérée comme optimale.

Ce rapport donne suite à la saisine de l'ANSES par le Directeur général de la santé, la Directrice générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes et le Directeur général de la prévention des risques, pour la réalisation de l'appui scientifique et technique concernant l'étude de la vérification de la stabilité de la teneur en éthanol dans des produits hydro-alcooliques désinfectants au cours de leur utilisation.

La convention ANSES-SCL en date du 13 octobre 2020 fixe les conditions de réalisation à partir de produits-hydro alcooliques commerciaux et des quatre scénarii prédéfinis.

Cette étude consiste à doser l'éthanol dans des solutions (SHA) et gels (GHA) hydro-alcooliques en conditionnements divers selon des fréquences variables de manière à couvrir les modes de consommation usuels de ces produits. Une analyse qualitative est réalisée en parallèle afin d'identifier la présence de co-formulants.

Plan :

Partie I : Scénarii et conditions de réalisation

Partie II : Résultats et exploitation

Annexes :

Annexe 1 - Références et lots des produits examinés

Annexe 2 - Protocole de prélèvement (ponction)

Annexe 3 - Protocole analytique pour déterminer la masse volumique

Annexe 4 - Protocole analytique pour déterminer la teneur en éthanol

Annexe 5 - Performance de la méthode de dosage de l'éthanol

Annexe 6 - Matériels, réactifs

Annexe 7 - Données de suivi des conditions ambiantes

Partie I : Scénarii et conditions de réalisation

Les produits étudiés sont des produits commerciaux fournis par l'ANSES et non des gels ou solutions faites à façon pour cette étude. Les ponctions sont réalisées les jours ouvrés uniquement, c'est-à-dire du lundi au vendredi sauf jour férié.

Scénario n°1 :

Conditionnement : petit flacon (utilisation personnelle peu intensive/sac à main).

Fréquence de prélèvement : une fois par semaine.

Fréquence d'analyse : une fois par semaine.

Période du test : du 29 septembre 2020 au 16 février 2021 (durée de 5 mois).

La GHA est conditionné en flacon de 100 mL avec bouchon à clapet.

La SHA est conditionnée en flacon de 100 mL avec bouchon à bascule.

Les flacons sont agités avant les prélèvements et refermés entre deux ponctions.

Scénario n°2 :

Conditionnement : flacon de contenance moyenne (usage modéré) avec pompe doseuse.

Fréquence de prélèvement : ponction toutes les deux heures pendant 8H à 10H (amplitude horaire 8H – 17H à 9H - 18H sur jours ouvrés).

Fréquence d'analyse : analyse des prélèvements en début et fin de journée chaque jour et, selon la fin du flacon le dernier jour (jour1-matin1, jour1matin2, jour1-soir...).

Deux ponctions successives sont réalisées le matin. La première va permettre d'évaluer la qualité du produit resté dans le corps de la pompe pendant la nuit.

Période du test : du 23 novembre 2020 au 14 décembre 2020 (durée de 3 semaines).

Le GHA est conditionné dans un flacon de 500 mL avec pompe doseuse.

La SHA est conditionnée dans un flacon de 500 mL avec pompe doseuse.

Les flacons ne sont pas agités entre deux ponctions, la tête de la pompe est laissée en position ouverte entre deux ponctions.

Scénario n°3 :

Conditionnement : flacon de 1 L à usage intensif collectif avec pompe doseuse (exemple : flacon disponible à l'entrée de commerce).

Fréquence de prélèvement : ponction toutes les 5 minutes pendant 8 à 10 H (amplitude horaire journalière du laboratoire de 8H – 17H à 9H - 18H (jours ouvrés)).

Fréquence d'analyse : analyse sur les prélèvements P0 (ouverture du flacon), P2 (P0+2 heures), P4 (P0+4 heures). Pour le dernier jour, l'analyse est faite sur la dernière ponction possible.

Période du test : du 12 au 14 janvier 2021 (durée de 3 jours).

Le GHA est conditionné dans un flacon de 1 L avec pompe doseuse.

La SHA est conditionnée dans un flacon de 1 L avec pompe doseuse.

Les flacons ne sont pas agités entre deux ponctions, la tête de la pompe est laissée en position ouverte entre deux ponctions.

Remarques communes au scénario 1 à 3 :

- La ponction est fixée à 3 mL.
- Pour refléter au mieux les conditions réelles d'utilisation des flacons par un consommateur, le bouchon n'est pas dévissé pour réaliser la ponction. Le liquide ou gel est versé directement dans le corps d'une seringue en plastique graduée, aussitôt refermée jusqu'au moment de l'analyse (voir photos en annexe).
- Deux unités de chaque catégorie sont vidées simultanément de manière à disposer de la quantité suffisante pour l'analyse (détermination de la masse volumique et dosage de l'alcool). Une ponction égale est faite sur chaque unité (même lot).

Scénario n°4 :

Conditionnement : bidon de 5 L pour transvasement de 200 mL dans des flacons.

Fréquence de prélèvement : durée d'ouverture du bidon 15 minutes par jour pour un transvasement de 200 mL.

Manipulation une fois par jour.

Fréquence d'analyse : une fois par jour du lundi au vendredi sauf jour férié.

Période du test : du 12 octobre 2020 au 17 novembre 2020 (durée de 5 semaines).

Le GHA est conditionné dans un bidon de 5 L avec bouchon à vis.

La SHA est conditionnée dans un bidon de 5 L avec bouchon à vis.

Les bidons ne sont pas agités avant ponction. Ils sont sortis de l'armoire de stockage, posés sur une surface plane dans la pièce de stockage ouverts pendant 15 minutes au total, la ponction étant réalisée dès l'ouverture: le bidon une fois ouvert est penché au-dessus d'un flacon gradué jusqu'à transvaser 200 mL. Le bouchon est revissé entre deux ponctions.

Entreposage des produits testés :

Les flacons et bidons sont stockés dans une armoire dédiée pourvue d'une évacuation non motorisée (vapeurs résiduelles). L'armoire est placée dans une pièce de 25 m² à température ambiante non thermostatée (cf. annexe 7), relevé des températures), c'est-à-dire que température n'est pas ajustée finement à partir d'une consigne. Les produits sont sortis de l'armoire au moment des ponctions ; pendant la durée de ces manipulations, ils restent dans la même pièce que l'armoire de stockage. Les seringues d'aliquotes sont stockées dans l'armoire jusqu'au moment des essais (autres salles du laboratoire).

Essais réalisés :

En début d'étude, un screening des gels et liquides hydro-alcooliques est effectué en Chromatographie en phase gazeuse avec détecteur de masse (CPG-SM) sur injection liquide et espace de tête. Ces essais purement qualitatifs ont vocation à identifier d'autres co-formulants organiques.

Le dosage de l'éthanol est réalisé sur GC-FID en mode split/splitless via une droite d'étalonnage comprenant 6 points, et avec comme étalon interne le propanol-1. Le résultat donné (moyenne obtenue à partir de deux prises d'essais) est exprimé en % m/m, puis en % v/v après détermination de la masse volumique à 20°C via un densimètre électronique avec tube oscillant en U.

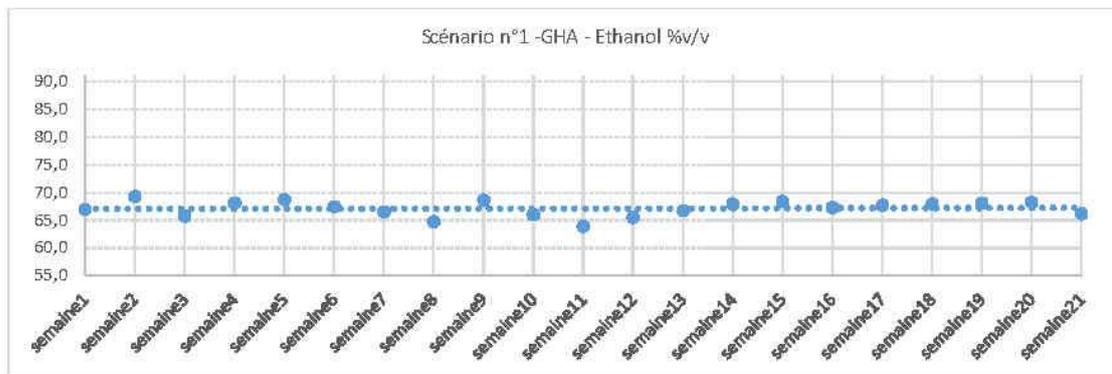
Partie II : Résultats et exploitation

Scénario n°1 – GHA

Semaine	semaine1	semaine2	semaine3	semaine4	semaine5	semaine6	semaine7	semaine8
Teneur %m/m	58,9	61,0	57,8	60,0	60,6	59,4	58,6	57,0
Teneur %v/v	66,9	69,3	65,7	68,1	68,7	67,4	66,5	64,7
Masse volumique g/cm ³	0,896	0,896	0,896	0,896	0,895	0,896	0,896	0,896

Semaine	semaine9	semaine10	semaine11	semaine12	semaine13	semaine14	semaine15
Teneur %m/m	60,5	58,0	56,3	57,7	58,7	59,8	60,2
Teneur %v/v	68,6	66,0	63,9	65,5	66,7	67,9	68,4
Masse volumique g/cm ³	0,896	0,897	0,896	0,896	0,896	0,896	0,896

Semaine	semaine16	semaine17	semaine18	semaine19	semaine20	semaine21
Teneur %m/m	59,2	59,6	59,8	59,9	60,1	58,3
Teneur %v/v	67,3	67,7	67,9	68,1	68,2	66,2
Masse volumique g/cm ³	0,896	0,896	0,896	0,896	0,896	0,896



- En plus de l'éthanol, l'analyse par CPG-SM a mis en évidence le glycérol, des traces de propanol-1, des traces de dioctylphtalate et de dioctylisophtalate.

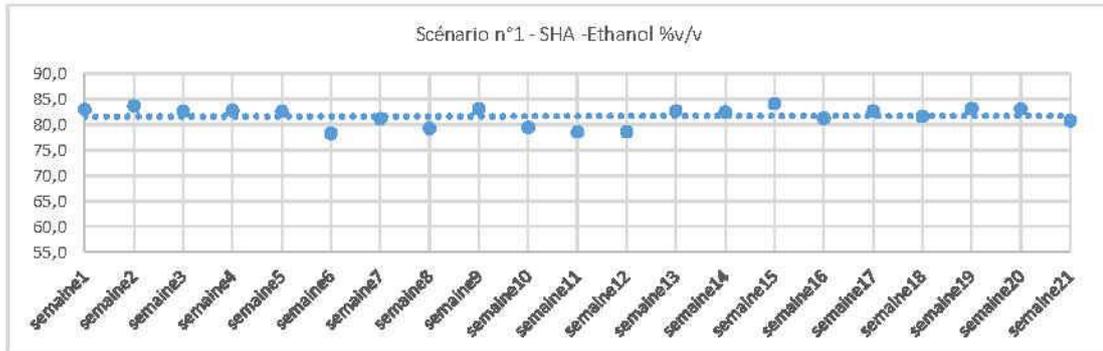
La teneur en éthanol est stable dans le temps. Les variations constatées reflètent la performance de la méthode.

Scénario n° 1 – SHA

Semaine	semaine1	semaine2	semaine3	semaine4	semaine5	semaine6	semaine7	semaine8
Teneur %m/m	76,3	76,9	75,9	76,1	75,9	71,9	74,6	72,8
Teneur %v/v	83,0	83,7	82,6	82,8	82,6	78,3	81,2	79,3
Masse volumique g/cm ³	0,859	0,859	0,859	0,859	0,858	0,859	0,859	0,859

Semaine	semaine9	semaine10	semaine11	semaine12	semaine13	semaine14	semaine15
Teneur %m/m	76,4	73,1	72,3	72,3	76,1	75,9	77,4
Teneur %v/v	83,1	79,5	78,6	78,6	82,7	82,5	84,1
Masse volumique g/cm ³	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858

Semaine	semaine16	semaine17	semaine18	semaine19	semaine20	semaine21
Teneur %m/m	74,8	76,1	75,1	76,6	76,6	74,6
Teneur %v/v	81,3	82,7	81,6	83,2	83,1	80,8
Masse volumique g/cm ³	0,858	0,858	0,857	0,857	0,856	0,855



La teneur en éthanol est stable dans le temps. Les variations constatées reflètent la performance de la méthode.

- En plus de l'éthanol, l'analyse par CPG-SM a mis en évidence le glycérol.

Scénario n°2 – GHA

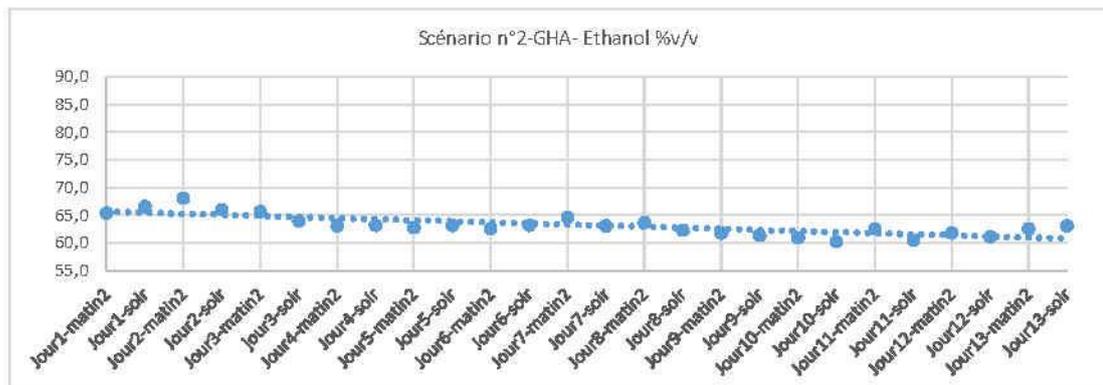
- Mesures du matin (2^{ème} mesure après réamorçage de la pompe) et du soir sur 13 jours ouvrés jusqu'à vider le flacon.

Matin-soir	jour1-matin2	jour1-soir	jour2-matin2	jour2-soir	jour3-matin2	jour3-soir	jour4-matin2	jour4-soir
Teneur %m/m	57,2	58,2	59,4	57,7	57,4	55,9	55,0	55,1
Teneur %v/v	65,4	66,6	68,1	66,0	65,7	64,0	63,1	63,2
Masse volumique g/cm ³	0,903	0,903	0,904	0,903	0,903	0,903	0,904	0,904

Matin-soir	jour5-matin2	jour5-soir	jour6-matin2	jour6-soir	jour7-matin2	jour7-soir	jour8-matin2	jour8-soir
Teneur %m/m	54,8	55,2	54,7	55,2	56,5	55,1	55,6	53,5
Teneur %v/v	62,8	63,2	62,6	63,2	64,7	63,1	63,7	62,3
Masse volumique g/cm ³	0,904	0,903	0,903	0,903	0,903	0,903	0,903	0,903

Matin-soir	jour9-matin2	jour9-soir	jour10-matin2	jour10-soir	jour11-matin2	jour11-soir	jour12-matin2	jour12-soir
Teneur %m/m	54,0	53,7	53,3	52,7	54,7	52,9	54,0	53,4
Teneur %v/v	61,8	61,4	61,0	60,3	62,6	60,5	61,8	61,1
Masse volumique g/cm ³	0,903	0,903	0,903	0,903	0,903	0,903	0,903	0,903

Matin-soir	jour13-matin2	jour13-soir
Teneur %m/m	54,7	55,1
Teneur %v/v	62,6	63,1
Masse volumique g/cm ³	0,904	0,903

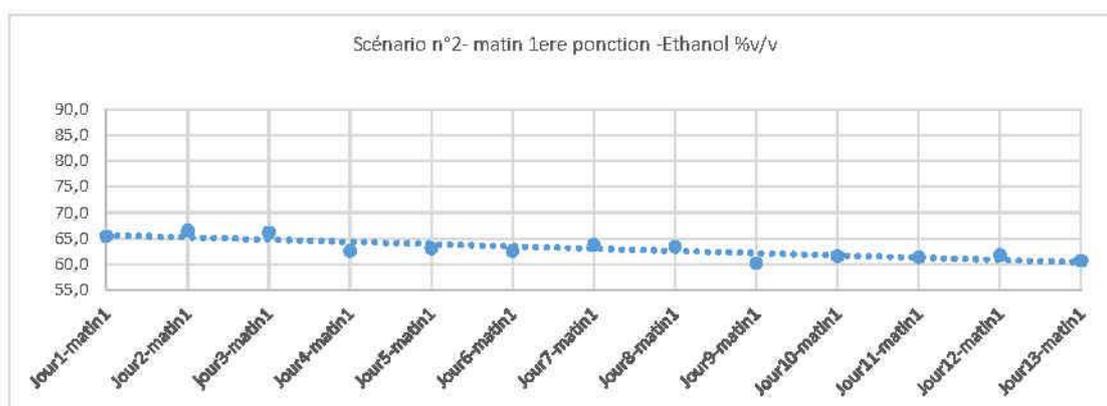


La courbe de tendance montre une légère chute du taux d'éthanol dans le temps.

- Mesures du matin lors du réamorçage de la pompe

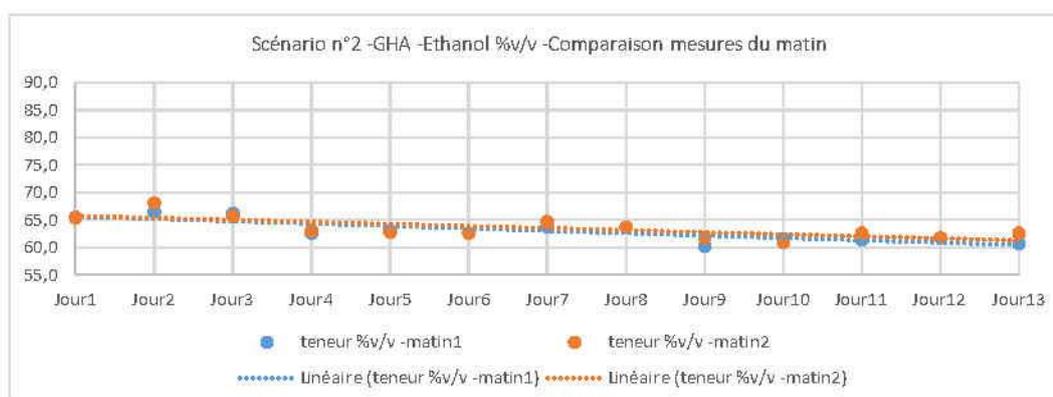
Matin1	jour1-matin1	jour2-matin1	jour3-matin1	jour4-matin1	jour5-matin1	jour6-matin1	jour7-matin1
Teneur %m/m	57,2	58,1	57,8	54,6	55,1	54,7	55,7
Teneur %v/v	65,5	66,5	66,2	62,6	63,1	62,6	63,8
Masse volumique g/cm ³	0,904	0,903	0,904	0,904	0,903	0,903	0,903

Matin1	jour8-matin1	jour9-matin1	jour10-matin1	jour11-matin1	jour12-matin1	jour13-matin1
Teneur %m/m	55,4	52,7	53,8	53,6	54,0	53,0
Teneur %v/v	63,4	60,2	61,6	61,4	61,8	60,7
Masse volumique g/cm ³	0,903	0,903	0,902	0,903	0,902	0,903



La courbe de tendance montre une chute du taux d'éthanol dans le temps (65%v/v à 61%v/v).

- Comparaison des mesures du matin réamorçage de la pompe suivi d'une 2^{ème} ponction



La ponction de réamorçage ne diffère pas de celle qui suit immédiatement. Le produit restant dans le corps de la pompe, n'évolue pas pendant la nuit (période de 12 à 14H) et entre le vendredi soir (jours 3, 8,12) et le lundi matin (jours 4, 9,13).

- En plus de l'éthanol, l'analyse par CPG-SM a mis en évidence du glycérol, des traces de propanol-1, d'isobutanol et des traces d'acétate d'éthyle.

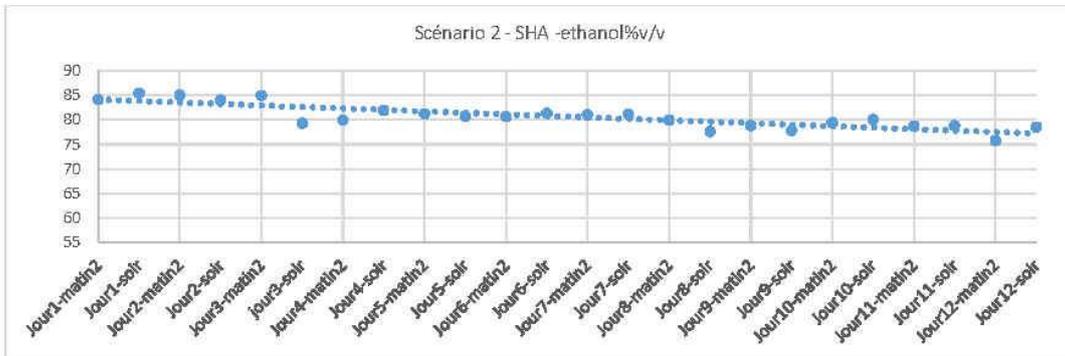
Scénario n°2 – SHA

- Mesures du matin (2ème mesure après réamorçage de la pompe) et du soir sur 12 jours ouvrés jusqu'à vider le flacon.

Matin-soir	jour1-matin2	jour1-soir	jour2-matin2	jour2-soir	jour3-matin2	jour3-soir	jour4-matin2	jour4-soir
Teneur %m/m	77,4	78,5	78,2	77,2	78,1	72,9	73,4	75,3
Teneur %v/v	84,1	85,4	85,0	84,0	84,9	79,3	79,9	81,9
Masse volumique g/cm ³	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858

Matin-soir	jour5-matin2	jour5-soir	jour6-matin2	jour6-soir	jour7-matin2	jour7-soir	jour8-matin2	jour8-soir
Teneur %m/m	74,7	74,2	74,1	74,7	74,5	74,6	73,5	71,3
Teneur %v/v	81,2	80,7	80,6	81,3	81,0	81,1	79,9	77,6
Masse volumique g/cm ³	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858

Matin-soir	jour9-matin2	jour9-soir	jour10-matin2	jour10-soir	jour11-matin2	jour11-soir	jour12-matin2	jour12-soir
Teneur %m/m	72,4	71,5	73,0	73,5	72,4	72,5	69,6	72,2
Teneur %v/v	78,8	77,8	79,4	80,0	78,7	78,8	75,7	78,5
Masse volumique g/cm ³	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858

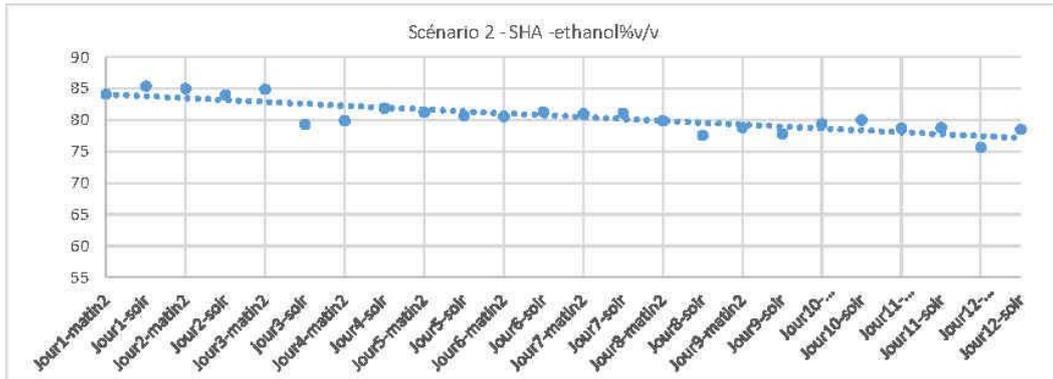


La courbe de tendance montre une baisse du taux d'éthanol dans le temps (84%v/v à 77%v/v).

- Mesures du matin lors du réamorçage de la pompe

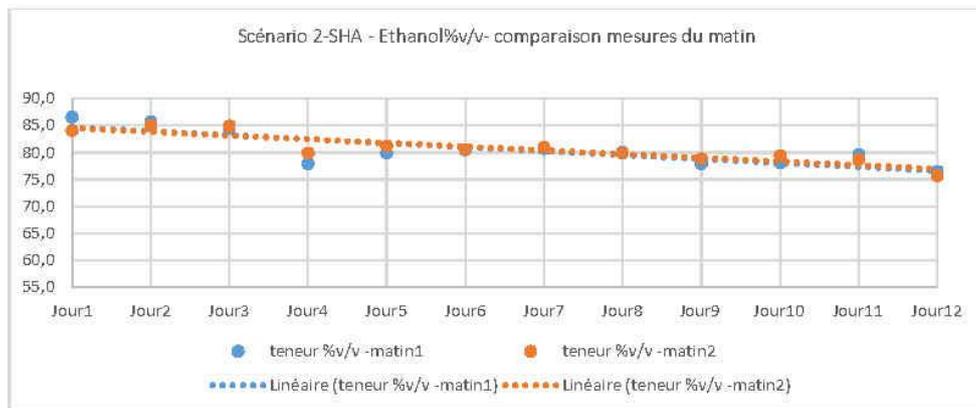
Matin1	jour1-matin1	jour2-matin1	jour3-matin1	jour4-matin1	jour5-matin1	jour6-matin1	jour7-matin1
Teneur %m/m	76,9	78,7	77,6	71,6	73,5	74,1	74,2
Teneur %v/v	86,6	85,7	84,4	77,9	79,9	80,5	80,7
masse volumique g/cm ³	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858	0,858

Matin1	jour8-matin1	jour9-matin1	jour10-matin1	jour11-matin1	jour12-matin1
Teneur %m/m	73,7	71,6	71,8	73,2	70,4
Teneur %v/v	80,1	77,9	78,1	79,6	76,5
masse volumique g/cm ³	0,858	0,859	0,859	0,858	0,858



La courbe de tendance montre une baisse du taux d'éthanol dans le temps (85 à 76%v/v).

- Comparaison des mesures du matin réamorçage de la pompe suivi d'une 2^{ème} ponction



La qualité de la ponction de réamorçage ne diffère pas de celle qui suit immédiatement. Le produit restant dans le corps de la pompe, n'évolue pas pendant la nuit (période de 12 à 14H) et entre le vendredi soir (jours 3, 8) et le lundi matin (jours 4,9).

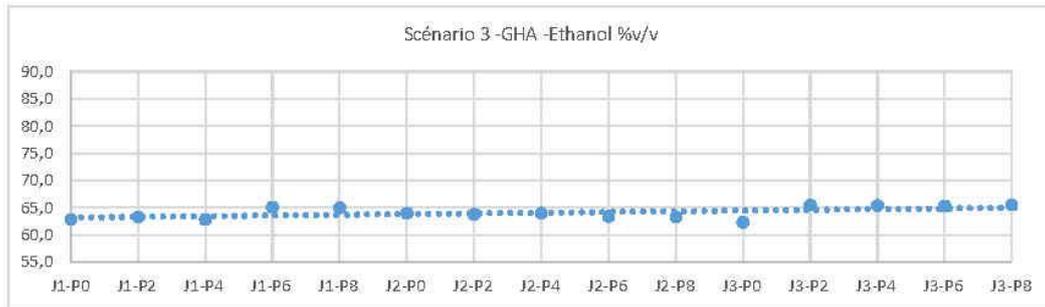
- En plus de l'éthanol, l'analyse par CPG-SM a mis en évidence du glycérol.

Scénario n°3 -GHA

P0 : 1^{ère} analyse de la journée, P2 analyse 2 heures après ...

Analyse toutes les 2 heures	J1-P0	J1-P2	J1-P4	J1-P6	J1-P8	J2-P0	J2-P2	J2-P4
Teneur %m/m	55,0	55,7	55,0	57,0	56,9	56,0	55,8	55,8
Teneur %v/v	62,8	63,3	62,8	65,1	65,0	64,0	63,8	64,0
Masse volumique g/cm ³	0,901	0,902	0,902	0,901	0,901	0,902	0,902	0,901

Analyse toutes les 2 heures	J2-P6	J2-P8	J3-P0	J3-P2	J3-P4	J3-P6	J3-P8
Teneur %m/m	55,4	55,4	54,5	57,4	57,2	57,1	57,3
Teneur %v/v	63,4	63,3	62,3	65,5	65,4	65,3	65,5
Masse volumique g/cm ³	0,901	0,902	0,902	0,901	0,902	0,902	0,902



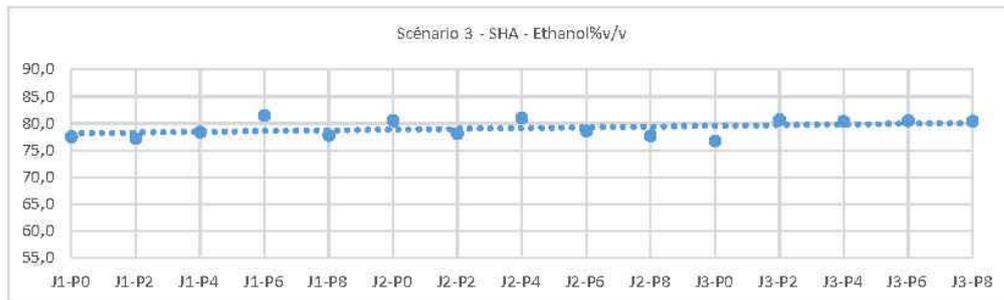
Pas de chute de la teneur en éthanol pendant la durée du test.

- En plus de l'éthanol, l'analyse par CPG-SM a mis en évidence du glycérol, des traces d'isobutanol et des traces de propanol-1.

Scénario n°3 -SHA

Analyse toutes les 2 heures	J1-P0	J1-P2	J1-P4	J1-P6	J1-P8	J2-P0	J2-P2	J2-P4
Teneur %m/m	71,0	70,7	71,7	74,6	71,3	73,7	71,5	71,2
Teneur %v/v	77,5	77,2	78,4	81,5	77,8	80,5	78,1	81,0
Masse volumique g/cm ³	0,861	0,862	0,862	0,862	0,861	0,862	0,862	0,862

Analyse toutes les 2 heures	J2-P6	J2-P8	J3-P0	J3-P2	J3-P4	J3-P6	J3-P8
Teneur %m/m	72,0	71,0	70,1	73,8	73,6	73,9	73,6
Teneur %v/v	78,6	77,7	76,7	80,7	80,4	80,5	80,4
Masse volumique g/cm ³	0,861	0,863	0,862	0,862	0,862	0,86	0,862



Pas de chute de la teneur en éthanol pendant la durée du test.

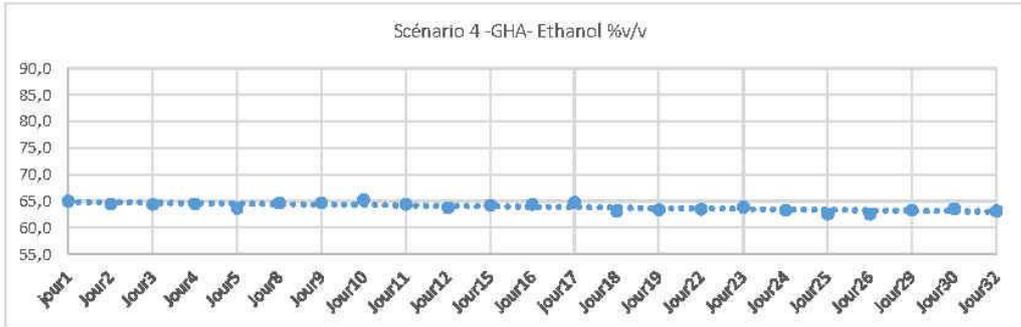
- En plus de l'éthanol, l'analyse par CPG-SM a mis en évidence du glycérol, des traces d'isobutanol, des traces de propanol-1 et des traces d'acétate d'éthyle.

Scénario n°4 -GHA

Jour	jour1	jour2	jour3	jour4	jour5	jour6	jour9	jour10
Teneur %m/m	58,6	56,3	56,2	56,3	55,6	56,5	56,5	57,0
Teneur %v/v	65,0	64,5	64,4	64,5	63,7	64,7	64,7	65,3
Masse volumique g/cm ³	0,904	0,904	0,904	0,904	0,904	0,904	0,904	0,904

Jour	jour11	jour12	jour15	jour16	jour17	jour18	jour19	jour22
Teneur %m/m	56,2	55,8	56,1	56,2	56,6	55,2	55,4	55,4
Teneur %v/v	64,4	63,8	64,3	64,4	64,8	63,2	63,4	63,5
Masse volumique g/cm ³	0,904	0,904	0,904	0,904	0,904	0,904	0,904	0,904

Jour	jour23	jour24	jour25	jour26	jour29	jour30	jour32
Teneur %m/m	55,7	55,3	54,6	54,6	55,2	55,5	55,1
Teneur %v/v	63,9	63,3	62,6	62,6	63,3	63,6	63,2
Masse volumique g/cm ³	0,904	0,904	0,904	0,904	0,904	0,905	0,905



La courbe de tendance montre une légère baisse de la teneur en éthanol dans le temps.

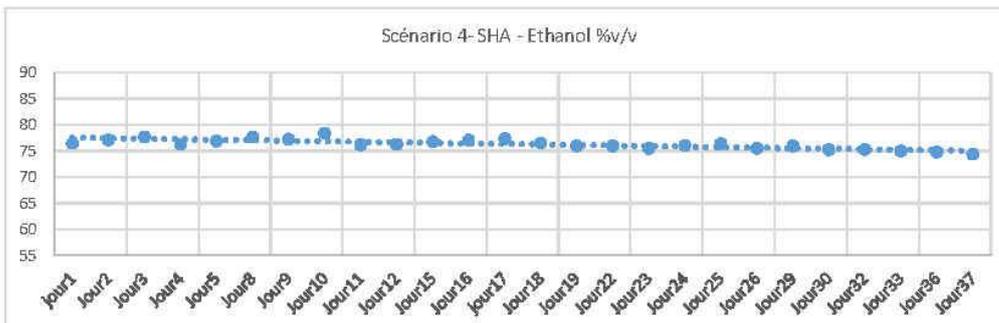
- En plus de l'éthanol, l'analyse par CPG-SM a mis en évidence du glycérol, traces de 3-méthyl-1-butanol.

Scénario n°4 -SHA

Jour	jour1	jour2	jour3	jour4	jour5	jour8	jour9	jour10
Teneur %m/m	76,5	77,1	77,7	76,3	76,9	77,7	77,3	78,4
Teneur %v/v	82,8	83,5	84,1	82,6	83,2	84,1	83,7	84,8
Masse volumique g/cm ³	0,854	0,854	0,854	0,854	0,854	0,854	0,854	0,854

Jour	jour11	jour12	jour15	jour16	jour17	jour18	jour19	jour22
Teneur %m/m	76,2	76,3	76,8	77,1	77,4	76,5	76	76
Teneur %v/v	82,5	82,6	83,1	83,4	83,8	82,7	82,3	82,3
Masse volumique g/cm ³	0,854	0,854	0,854	0,854	0,854	0,854	0,854	0,854

Jour	jour23	jour24	jour25	jour26	jour29	jour30	jour32	jour33	jour36	jour37
Teneur %m/m	75,5	76,1	76,4	75,5	76	75,3	75,3	75	74,8	74,4
Teneur %v/v	81,7	82,4	82,7	81,7	82,2	81,5	81,5	81,2	81	80,6
Masse volumique g/cm ³	0,854	0,854	0,854	0,854	0,854	0,854	0,855	0,854	0,855	0,855



La courbe de tendance montre une légère baisse de la teneur en éthanol dans le temps.

- En plus de l'éthanol, l'analyse par CPG-SM a mis en évidence du glycérol, des traces de propanol-1, des traces de butanol-1 et des traces d'acétate d'éthyle.

Constats et bilan :

Les solutions hydro-alcooliques étudiées sont toutes plus concentrées en éthanol que les gels.

Les gels sont de la même marque et de deux lots différents avec une teneur en éthanol initiale de 66- 67%v/v.

Les solutions hydro-alcooliques sont de trois marques distinctes et présentent globalement une teneur initiale en éthanol plus élevée que celles des gels : 82% v/v pour le flacon de 100 ml, 84 %v/v pour le flacon de 500 mL, 78% v/v pour le flacon de 1L et 82% v/v pour le bidon de 5L.

Les tendances observées pour les gels et pour les solutions sont similaires pour un même scénario.

Scénario n°1 avec une ponction hebdomadaire pendant 5 mois, aucune évolution globale n'a été constatée, les variations observées étant imputables à la performance de la méthode d'analyse.

Scénario n°2 : la durée du test est plus courte que pour le scénario n°1 soit 3 semaines, avec des ponctions quotidiennes matin et soir pour analyses. Les essais montrent que les caractéristiques du produit restant dans le corps de la pompe pendant une nuit ou samedi et dimanche sont similaires à celles du produit restant dans le contenant. Toutefois, sur la durée la tendance est à la baisse pour les deux matrices, avec une baisse légèrement plus marquée pour la solution que pour le gel, sans descendre en dessous de 60%v/v, même pour le gel présentant une teneur d'alcool de 65% à t0.

Scénario n°3 : Avec une durée de test assez courte de 3 jours et un nombre de dosages relativement restreint, il est difficile de dégager une tendance. Le constat, identique au gel et à la solution montre une certaine stabilité des produits sans chute de la teneur en éthanol.

Scénario n°4 : Au cours des 5 semaines de test, la teneur en éthanol chute légèrement soit 2% en valeur absolue. A noter que le bidon de gel hydro alcoolique était sous rempli (800 mL de moins que celui de la solution hydro-alcoolique).

Annexe I - Références et lots des produits examinés

Scenario n°1 :



Gel hydro alcoolique :
4 flacons de 100 mL avec
bouchon à clapet



Solution hydro alcoolique :
4 flacons de 100 mL avec
bouchon-bascule

Scenario n°2 :



Gel hydro alcoolique :
3 flacons de 500 mL avec
bouchon-pompe



Solution hydro alcoolique :
3 flacons de 500 mL avec
bouchon pompe

Scenario n°3 :



Gel hydro alcoolique :
3 bouteilles de 1L avec
bouchon-pompe manuelle



Solution hydro alcoolique :
3 bouteilles de 1L avec
bouchon à vis fournie avec la
pompe - pompe manuelle

Scenario n°4 :



Gel hydro alcoolique :
2 bidons de 5L avec
bouchon à vis



Solution hydro
alcoolique :
2 bidons de 5L avec
bouchon à vis

Annexe 2 - Protocole de prélèvement (ponction)

- Scénarii 1 à 3:

Pour cette étude, le laboratoire a dû imaginer un protocole spécifique pour aliquoter chaque flacon en reproduisant au plus près le mode d'utilisation des solutions et gels hydro alcooliques.

Contrairement à la démarche analytique usuelle qui consiste à ouvrir le flacon pour y prélever la quantité nécessaire aux essais, ici, l'intégrité du contenant a été conservée : l'aliquote a été récupérée à la sortie de l'orifice par pression de la main sur le corps du flacon ou en appuyant sur la pompe.

Le récipient de récupération est une seringue en matière plastique dont la sortie a été fermée et le piston ôté.

Une ponction correspond à 3 mL (environ). La plupart des pompes étant conçues pour délivrer 1 mL à la fois, il est exercé autant de pressions que nécessaire jusqu'à l'obtention de 3 mL (graduation de la seringue).

Une fois le volume de 3 mL obtenu, le piston est repositionné, la seringue retournée, le bouchon est enlevé et le piston poussé jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'air dans le corps de la seringue. L'orifice de sortie est alors fermé et la seringue conservée jusqu'à l'analyse (des tests préalables ont été menés pour vérifier l'étanchéité du montage). Cette opération est réalisée en double, une seringue pour la détermination de la masse volumique à 20°C et une seringue pour le dosage des alcools sur des flacons distincts du même lot.



- Scénario n°4 : le volume quotidien retiré par versement est récupéré dans un flacon en verre avec bouchon à vis (type flacon Schott). Les essais sont réalisés sur le volume retiré.

Annexe 3 - Protocole analytique pour déterminer la masse volumique

La détermination de la masse volumique des solutions et gels hydro-alcooliques est réalisée dans le but de pouvoir exprimer les résultats en % vol (ou %v/v, %volume) à partir des données du dosage quantitatif de l'éthanol (% m/m).

Elle est réalisée au moyen d'un densimètre à tube oscillant en U.

Une petite fraction (normalement inférieure à 1 ml) de l'échantillon d'essai est introduite dans la cellule pour échantillon à température contrôlée.

Consommables - Réactifs

Les réactifs sont de qualité analytique.

- Eau déminéralisée ou de pureté au moins équivalente
- Ethanol

Seringues en polypropylène à usage unique, bouchons adapté pour embout de seringue.

Matériel :

- (Densimètre électronique à tube en U oscillant, capable, une fois étalonné, de déterminer une masse volumique avec une résolution de 0,0001 g/cm³ ou mieux
- Bain ultra-sons

Mode opératoire :

La mesure est faite en double. L'échantillon est introduit à l'aide de la seringue à usage unique utilisée pour l'aliquotage.

Entre deux échantillons, le tube est rincé à l'eau-éthanol, puis séché à l'air soufflé.

Critères d'approbation des résultats :

La série d'échantillon est validée quand la qualification de performance (QP) du densimètre utilisé est conforme. Cette vérification de routine est réalisée chaque jour d'utilisation avant la première mesure. Il s'agit de réaliser un « water check » à l'aide d'eau déminéralisée. La masse volumique de l'eau à 20°C doit être comprise entre 0,9977 et 0,9987 g/cm³.

Pour un échantillon, le résultat est validé quand la différence en valeur absolue entre les deux résultats est inférieure ou égale à 0,001 g/cm³.

Expression des résultats :

Le résultat final est la moyenne des résultats obtenus à partir des mesures en double. Il est exprimé en g/cm³.

Annexe 4 - Protocole analytique pour déterminer la teneur en éthanol

Le dosage est effectué par chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) selon une méthode interne qui permet également le dosage du méthanol et de l'isopropanol. Lors du dosage, les échantillons sont analysés en double.

L'analyse est effectuée en deux étapes : screening puis dosage :

- **SCREENING** : Cette étape a pour but de vérifier que le propanol-1 peut être utilisé comme étalon interne. Pour chaque échantillon préparé sans ajout d'étalon interne, vérifier que le chromatogramme ne présente aucun pic ayant approximativement le même temps de rétention que le propanol-1. Si un pic interférant est observé, l'étalon interne est changé pour le butanol.
- **DOSAGE** : quantification de l'éthanol.

Solution étalon, gamme standard :

Solution standard mère à 10 g/L : 0,5 g d'alcool (à 0,1g près) dans une fiole jaugée de 50 mL

- 0,5 g d'éthanol
- 0,5 g d'isopropanol
- 0,5 g de méthanol

Solution d'étalon interne à 10 g/L : 0,5 g de propanol-1 (à 0,1g près) dans une fiole jaugée de 50mL

La gamme standard est réalisée en transférant respectivement 0,05 mL - 0,25 mL - 0,5 mL - 1,0 mL - 2,5 mL et 5,0 mL dans des fioles jaugées de 10 mL.

Ajout à l'aide d'une pipette à 2 traits ou d'une pipette automatique qualifiée dans chaque fiole de 1,0 ml de la solution d'étalon interne. Complétude au trait de jauge avec l'acétate de butyle. Agitation.

Les concentrations des solutions standards filles obtenues sont les suivantes (en g/L) :

Substance	Volume de solution mère versée					
	0,05	0,25	0,5	1	2,5	5
Ethanol	0,25	1,25	2,5	5	12,50	25,00

Les 6 solutions filles sont mises en vials fermés avec des bouchons non pré-percés

Remarque :

- le "blanc" correspond à l'acétate de butyle filtré dans un vial.

Préparation des échantillons :

1 Échantillons sans ajout d'étalon interne

Une seule prise d'essai par échantillon, par pesée de 0,25 g (0,1 mg près) dans une fiole jaugée de 50 mL. Ajout d'environ 40mL d'acétate de butyle. Agitation vigoureuse jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Si besoin passage au bain ultrason ou au vortex. Complétude au trait de jauge puis filtration sur filtre seringue dans un vial de 2mL fermé par un bouchon non pré-percé.

Screening par CPG-FID (pour vérifier la présence ou non du propanol-1).

2 Échantillons avec ajout d'étalon interne

Une double prise d'essai par échantillon, par pesée de 0,25g (0,1 mg près) dans une fiole jaugée de 50 mL. Ajout de 5 mL de la solution d'étalon interne à l'aide d'une pipette à 2 traits ou d'une pipette automatique.

Ajout d'environ 40mL d'acétate de butyle. Agitation vigoureuse jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Si besoin passage au bain ultrason ou au vortex. Complétude au trait de jauge puis filtration sur filtre seringue dans un vial de 2mL fermé par un bouchon non pré-percé.

Préparation du contrôle interne qualité (CIQ) :

- Il s'agit d'un CIQ synthétique correspondant à 1 g/L préparé à partir d'une solution mère d'éthanol indépendante.

Conservation des solutions préparées :

- Solution standard mère : une semaine au réfrigérateur
- Solutions standards fille : le jour de l'analyse
- Solution d'étalon interne : un mois au réfrigérateur
-

Conditions chromatographiques :

Mode d'injection en split ; ratio de split 1
Débit total du gaz vecteur (azote) 1,0 ml/min ; 14,5 psi
Débit total 50 mL/min
Débit dans la colonne 1,5 mL/min
Vitesse linéaire 34,3 cm/seconde
Débit de purge 3,0 mL/min
Volume injecté 1 µL

Injecteur : 220°C

Programme de température du four : température initiale 35°C pendant 9 minutes ; rampe 20°C/min jusque 230°C puis pallier pendant 6,25 minutes.

Ordre de sortie des molécules :

1. Méthanol
2. Isopropanol
3. Éthanol
4. Propanol-1

Le logiciel chromatographique permet de tracer pour chaque molécule, une droite d'étalonnage Cette droite relie le rapport des surfaces du pic d'un standard sur le pic de l'étalon interne au rapport de la concentration de chaque solution standard sur la concentration de l'étalon interne.

Critères d'approbation des résultats :

La série est validée quand :

- Le coefficient de détermination des droites d'étalonnage des molécules sont supérieurs à 99,5 %
- Les CIQ qui encadrent les échantillons sont conformes. Dans le cas d'un CIQ synthétique, le résultat de ce dernier est conforme quand la teneur en éthanol est comprise entre 10 % de la valeur théorique.

L'écart relatif entre les résultats obtenus sur le même échantillon est inférieur ou égal à 10%.

Expression des résultats :

$$\text{Résultat } R\%(m/m) = \frac{C \times V \times 100 \times F}{1000 \times PE}$$

Avec :

- R : le résultat en concentration de proportion massique (% - g/100g),
- C : la concentration moyenne de chaque alcool présent dans l'échantillon en g/L donnée par le logiciel,
- V : volume de reprise de l'échantillon en mL,
- PE : la prise d'essai de l'échantillon en g,
- F : le facteur de dilution éventuel.

Ce calcul se fait automatiquement par le logiciel Solution® après saisie des données nécessaires : prise d'essai, volume de reprise, facteur de dilution.

Le résultat est la moyenne arithmétique des deux déterminations. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique %(m/m).

Expression des résultats en % Vol ou %v/v :

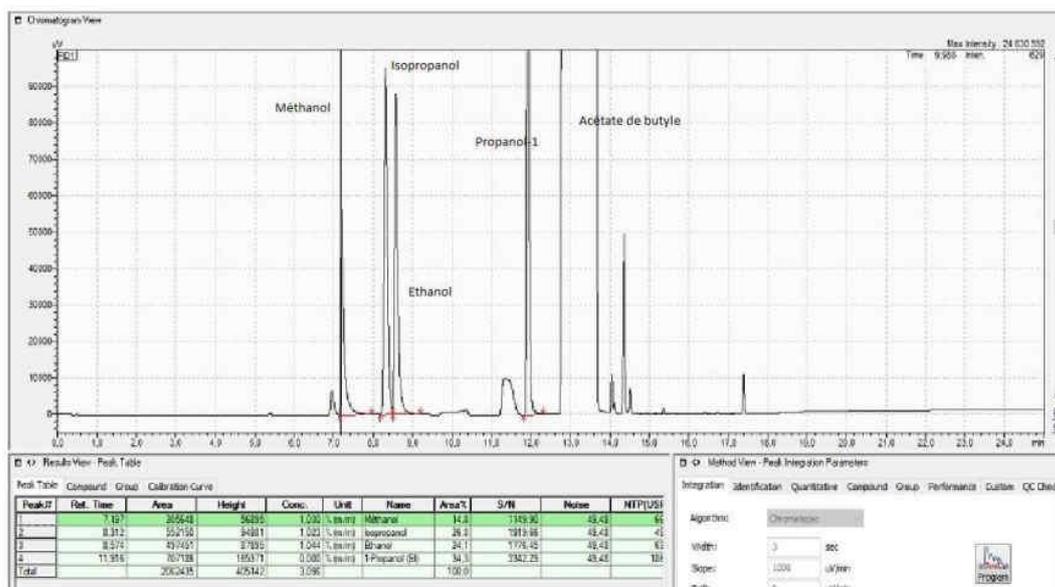
Pour exprimer la teneur de l'éthanol en %v/v à partir du %(m/m) on introduit la valeur de la masse volumique du produit étudié. Résultat :

$$R\% \text{ Vol} = \frac{R\%(m/m) \times MV}{0,789}$$

Avec

- MV la masse volumique du produit testé à 20°C
- 0,789 : masse volumique de l'éthanol à 20°C

Chromatogramme type sur les alcools :



Annexe 5 - Performance de la méthode de dosage de l'éthanol

La performance de la méthode a été menée sur les deux GC-FID utilisés pour l'étude, avec la formalisation d'un dossier essais sur la période août et septembre 2020 avec une procédure de vérification selon la norme NF V03-110

Extraits du dossier de validation (pour l'éthanol):

- Comparaison des résultats sur les deux équipements utilisés (Eq 1497 : Shimadzu 2030, Eq 1098 Shimadzu 2010)

Teneur en éthanol (%(m/m))			
	Eq 1497 (moyenne)	Eq 1098 (moyenne)	Ecart relatif
2020-11386	60,77	59,35	2,3%
2020-11399	70,3	67,31	4,3%
2020-11401	44,69	43,33	3,0%
2020-11414	65,91	63,59	3,5%
2020-11387	95,38	90,51	5,1%
CIQ EtOH 1-1	75,98	74,89	1,4%
CIQ Synth -1	1,21	1,18	2,5%
CIQ Synth -3	1,21	1,19	1,7%
Echantillon laboratoire EtOH 60% (v/v)	55,35	54,54	1,5%
Echantillon laboratoire EtOH 80% (v/v)	82,12	80,08	2,5%
Echantillon laboratoire Gel EtOH	56,01	55,64	0,7%

- L'étude de la fonction d'étalonnage a été menée sur 5 séries de 6 points, réalisées en condition de fidélité intermédiaire (deux opérateurs différents à des jours différents).
Points de gamme : 0,15 g/L, 0,25 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L, 2,5 g/L, 5 g/L (correspondants à 3 - 5 - 10 - 20 - 50 - 100 % (m/m) d'éthanol.
- Exactitude :
5 séries.
Pour chaque série :
 - Ethanol : 4 niveaux de concentrations :
 - 3% (m/m) : LQ, solution
 - 60% (v/v) : limite basse d'efficacité, solution
 - 80% (v/v) : concentration selon arrêté du 13 mars 2020, solution
 - 70% (v/v) : concentration selon arrêté du 13 mars 2020, gel
- Limite de quantification validée pour 3% m/m
- Incertitude de mesure :
 - Pour des teneurs comprises entre 3 %(m/m) \leq X < 8% (m/m) :
incertitude absolue élargie (k=2) : U = 0,8 % (m/m)
 - Pour des teneurs \geq 8% (m/m) :
incertitude relative élargie (k=2) : U% = 12%

Annexe 6 - Matériels, réactifs

- **Densimètre avec tube oscillant en U** ANTON PAAR 4500M (2017)
- **Balances** pour les pesées :
Echantillons sur SARTORIUS CP 220G/0,1MG (2006)
Etalons sur XS 204 METTLER TOLEDO/0,1mg (2009)
- **Systèmes de chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID)** de marque SHIMADZU avec passeur automatique
GC-2030 AF (2020)
GC-2010AF (2010)
Colonne chromatographique : Colonne capillaire SUPELCOWAX 10 30m X0,32 mm X 0,25µm (Supelco Sigma-Aldrich)
- **Système de chromatographie en phase gazeuse avec détecteur de masse (GC-MS)** de Shimadzu modèle QP2010SE (2012) avec combipal (injection liquide, espace de tête)
- **Pipettes automatiques** IVAP de marque Eppendorf.
- **Les étalons, solvants** ; fournisseur Carlo-Erba pour :
Acétate de butyle
Propanol-1,
Méthanol,
Isopropanol,
Ethanol absolu anhydre

Annexe 7 : Données de suivi des conditions ambiantes



Pendant la durée de l'étude, la température de la pièce ainsi que la température dans l'armoire de stockage (sonde flacon) sont relevées automatiquement avec une fréquence programmée de 4 par heure. Le taux d'humidité ambiante suit la même fréquence de relevés.

