



FINAL REPORT

Antimicrobial Efficacy Testing of Vinyl Textiles

PROTOCOL
ASTM E2180

PRODUCT TESTED
AGIVIR

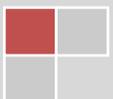
EMSL ORDER NUMBER
152001614

TESTING LABORATORY
EMSL Analytical, Inc.
5950 Fairbanks North Houston Rd.
Houston TX 77040
Phone: (713) 686-3635
Web: www.emsl.com

SPONSOR
Serge Ferrari
BP 54 - 38352
La Tour-du-Pin Cedex, 38110
France
Contact: Catherine Merillon

STUDY START DATE
March 5, 2020

STUDY COMPLETION DATE
March 30, 2020





Test Summary

Project Title: Antimicrobial Efficacy Testing of Vinyl Textile Materials

Study Methods: Protocol ASTM E2180

Sponsor: Serge Ferrari

Product: Textile Materials

Sample 1: AGIVIR – Top (X) & Bottom

Sample 2: 501 Control sample (Standard)

Test Conditions:

Challenge Organisms:

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) - ATCC 6538

Klebsiella pneumonia (*K. pneumonia*) - ATCC 31488

Contact time: 24 hours

Contact Temperature: 35°C

Study Dates and Facilities

All analytical testing was performed at EMSL Analytical, Inc. in Houston, Texas from date 3/5/2020 to 3/30/2020.

Record Retention

All raw data and a copy of the final report will be archived and stored by EMSL Analytical, Inc. for 5 years.



Objectives

To determine the antimicrobial activity of the AGIVIR (Top), and 501 control (Standard) material samples.

Experimental Summary:

The testing procedure was designed after discussions between EMSL Analytical, the testing company, and Serge Ferrari. The testing procedure follows ASTM E2180, with the testing conducted on vinyl textile samples submitted by Serge Ferrari for its ability to control (reduce) bacterial growth during a 24 hours exposure.

Test Method:

Culture preparation: *K. pneumonia* and *S. aureus* were grown separately on tryptic soy agar supplemented with sheep blood (TSAB) at 35°C for 24 hours. Well isolated colonies were then taken and placed into 10 mL of tryptic soy broth (TSB) and incubated at 35°C for 24 hours. Two separate agar slurries were prepared, one for each organism. The agar slurries contained 1 mL of the test organism broth with 0.85 g NaCl, 0.3 g agar, and 100 mL of deionized water. The final slurry inoculum concentration for *K. pneumonia* was 4.5×10^6 colony-forming units/mL (CFU/mL) and 2.5×10^6 CFU/mL for *S. aureus*.

Inoculation of test material: Serge Ferrari submitted textile test samples, AGIVIR (Top & Bottom) and an untreated control 501 sample (standard). The top sides were marked with a cross (X). EMSL supplied an untreated polyethylene film as a laboratory control material. Individual test and control pieces were cut in 2 X 2 inch squares and placed in 47 mm sterile Petri dishes. Each square was inoculated with 1 mL of the bacterial agar slurry as prepared above at a concentration of $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL and all tests were performed in triplicate. Simultaneously, the control film was similarly prepared and inoculated. The Petri dishes were sealed with Parafilm, placed into a sealed plastic container to avoid evaporation, and then incubated at 35°C for 24 hrs.

Recovery of Test Organisms: Following incubation, the entire inoculated test material was removed with pre-sterilized forceps and placed into 20 mL of D/E neutralizing broth. The material was then vortexed for 30 seconds to recover any remaining bacteria into suspension. The suspension was then serially diluted and plated onto aerobic plate count Petrifilm plates and incubated at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 hour before colonies were counted.



Experimental Results:

Table 1. Quantitative counts for *K. pneumonia* exposed to the AGIVIR (Topside & Backside), 501 control (standard), and lab control. The CFUs are based on the average of three Petrifilm counts.

Sample	Exposure Time (hours)	Bacterial Recovery CFU/Test Surface (average of 3 surfaces)	Log Reduction	% Reduction
Lab Control	0	5,230,000		
Lab Control	24	67,700,000		
501 Control Topside	24	83,700,000		
AGIVIR Topside	24	<100	>5.92	>99.9999
AGIVIR Backside	24	<100	>5.92	>99.9999

CFU: Colony forming Units, Detection limit = 100 CFU/test surface.

% Reduction – Percent difference between untreated population (501 Control Topside) and treated population recovered from the incubation period.

Table 2. Quantitative counts for *S. aureus* exposed AGIVIR (Topside & Backside), 501 control (standard) and lab control. The CFU are based on the average of three Petrifilm counts.

Sample	Exposure Time (hours)	Bacterial Recovery CFU/Test Surface (average of 3 surfaces)	Log Reduction	% Reduction
Lab Control	0	3,530,000		
Lab Control	24	17,000,000		
501 Control Topside	24	8,400,000		
AGIVIR Topside	24	55,300	2.19	99.3
AGIVIR Backside	24	3,740	3.37	99.96

CFU: Colony forming Units, Detection limit = 100 CFU/test surface.

% Reduction – Percent difference between untreated population (501 Control Topside) and treated population recovered from the incubation period.



Conclusions/Observations:

- The AGIVIR sample showed >99.9999% reduction of *K. pneumonia* on the both topside and backside.
- The AGIVIR sample showed 99.3% reduction of *S. aureus* on the topside and 99.96% on the backside.

Signatures

Study Performed by:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Ramadi".

Mona Ramadi, Ph.D.
Microbiologist

Report Issued by:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Jason Dobranic".

Jason Dobranic, Ph.D.
Vice President of Microbiology & Life Sciences
Study Director

R2006BFER004

Détermination de l'activité virucide de la surface Agivir après 5000 cycles martindale sur le coronavirus humain HCoV-229E pour des temps de contact de 5, 15 et 60 minutes.

Protocole adapté de la norme ISO 21702 (2019)

CLIENT

Mme Valérie Courault
SERGE FERRARI
BP54, 38352 La Tour-Du-Pin cedex, France

**PRESTATION
EFFECTUÉE PAR**

S.A.S VIRHEALTH
Site Laennec-La Buire, 2ème étage, Bat B
7-11 rue Guillaume Paradin,
69372 Lyon Cedex 08

**CONTRIBUTION
TECHNIQUE**

Léa Szpiro, responsable laboratoire
Dounia Bouchami, technicienne de laboratoire

Approbateur/Validation Qualité

Nom : Dr Vincent Moulès, Directeur Général

Date : Lyon, le 08/06/2020

Signature :



VirHealth
RTM Laennec
7-11 rue Paradin, 69008 Lyon
France

Ce rapport d'essai comporte 10 pages

SOMMAIRE

I. CONCLUSION	3
II. DOCUMENTS CONTRACTUELS	4
III. DONNÉES CONCERNANT LES ÉCHANTILLONS ET LES CONDITIONS D’ESSAI	4
III.1 IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS.....	4
III.2 CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	5
IV. RÉSULTATS	6
ACTIVITE VIRUCIDE DE LA SURFACE AGIVIR APRES 5000 CYCLES MARTINDALE SUR LE CORONAVIRUS HUMAIN HCoV-229E POUR DES TEMPS DE CONTACT DE 5, 15 ET 60 MINUTES	6
<i>a. Sensibilité cellulaire</i>	<i>6</i>
<i>b. Détermination de la cytotoxicité</i>	<i>6</i>
<i>c. Essai</i>	<i>7</i>
V. CONCLUSION.....	7
VI. ANNEXES	8
V.1 MATERIELS ET REACTIFS.....	8
V.2 PREPARATION DES REACTIFS	8
V.3 DONNEES BRUTES : QUANTIFICATION EN DICT50/ML DU CORONAVIRUS 229E AVEC UN TEMPS DE CONTACT DE 5,15 ET 60 MINUTES APRES LECTURE VISUELLE AU MICROSCOPE DES EFFETS CYTOPATHOGENES (4 PUIITS/DILUTION).....	9

I. CONCLUSION

Les activités virucides de la surface Agivir après 5000 cycles martindale et de la surface non active ont été évaluées selon un protocole adapté de la norme 21702 (2019) pour des temps de contact de 5, 15 et 60 min sur le coronavirus humain HCov-229E en présence d'interférence correspondant à un mélange artificiel mucus/salive.

La surface non active est la surface de référence pour l'essai.

- Agivir après 5000 cycles martindale, 5 minutes de temps de contact

Dans les conditions expérimentales, (20°C, 5 minutes, Interférence Mucus/salive), la membrane Agivir après 5000 cycles martindale montre une activité virucide associée à une réduction moyenne logarithmique de 2.17 log₁₀ correspondant à une efficacité de 99.32% selon le protocole adapté de la norme ISO 21702

- Agivir après 5000 cycles martindale, 15 minutes de temps de contact

Dans les conditions expérimentales, (20°C, 15 minutes, Interférence Mucus/salive), la membrane Agivir après 5000 cycles martindale montre une activité virucide associée à une réduction moyenne logarithmique de 3.37 log₁₀ correspondant à une efficacité de 99.96% selon le protocole adapté de la norme ISO 21702.

- Agivir après 5000 cycles martindale, 60 minutes de temps de contact

Dans les conditions expérimentales, (20°C, 60minutes, Interférence Mucus/salive), la membrane Agivir après 5000 cycles martindale montre une activité virucide associée à une réduction moyenne logarithmique de 3.87 log₁₀ correspondant à une efficacité de 99.99% selon le protocole adapté de la norme ISO 21702.

PRODUIT	Temps de contact (min)	Substance interférente	Réduction logarithmique (Log10)	Efficacité virucide (%)
Agivir après 5000 cycles martindale	5	Mucus/salive	2.17	99.32%
	15		3.37	99.96%
	60		3.87	99.99%

II. DOCUMENTS CONTRACTUELS

La présente prestation est définie par les documents suivants :

. Devis	DEV0010
. Commande	Bon pour accord en date du 15/05/2020

III. DONNÉES CONCERNANT LES ÉCHANTILLONS ET LES CONDITIONS D'ESSAI

III.1 Identification des échantillons

Surface d'essai : Agivir après 5000 cycles martindale

Surface témoin : surface non active

Aspect du produit fourni : blanc, lisse et non-poreux

Fabricant : SERGE FERRARI

Fournisseur : SERGE FERRARI

Condition de stockage : température ambiante

Période d'évaluation : 05/2020

III.2 Conditions expérimentales

Surface d'essai : Agivir après 5000 cycles martindale

Conditions expérimentales	
Date	- 27/05/2020
Souche virale	- Human coronavirus HCoV-229E
Surface des échantillons (cm ²)	- 1.5 cm x 1.5 cm = 2.25 cm ²
Surface de l'inoculum (cm ²)	- 1 cm x 1 cm = 1cm ²
Volume de l'inoculum	- 50uL
Température	20°C
Substance interférente	Mucus/salive
Temps de contact	5, 15 et 60 minutes
Neutralisation	- 2 mL de milieu d'infection sans SVF
Quantification	-Titration limite sur cellules permissives
Nombre de puits par dilution	4
Température d'incubation	34 ± 1 °C

IV. RÉSULTATS

Activité virucide de la surface Agivir après 5000 cycles martindale sur le coronavirus humain HCoV-229E pour des temps de contact de 5, 15 et 60 minutes

a. Sensibilité cellulaire

Surface	LOG TCID ₅₀ /mL
Agivir après 5000 cycles martindale	5.7
Surface non active	5.7
Différence < 1 log <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> no	

Le titrage comparatif du coronavirus humain HCoV-229E sur les cellules MRC5 inoculées avec les tampons de reprise de la surface Agivir après 5000 cycles martindale et de la surface non active a pour résultat une différence inférieure à 1 log₁₀. Les résultats montrent que les liquides de récupération des surfaces d'essais n'affectent pas la sensibilité des cellules MRC5 au coronavirus humain HCoV-229-E dans la procédure expérimentale utilisée.

b. Détermination de la cytotoxicité

La cytotoxicité des surfaces d'essai est déterminée par lecture visuelle des effets cytopathogènes (ECP) par microscopie et quantifiée par DICT50 sur les cellules permissives MRC5.

Pour la récupération du virus sur surface, les membranes sont immergées dans un volume de 2mL de milieu d'infection sans SVF (solution de récupération). La cytotoxicité des solutions de récupération est déterminée par lecture visuelle des ECP.

Dans les conditions de l'essai, en présence de la substance interférente (Mucus/salive) les solutions de récupération de la surface Agivir après 5000 cycles martindale et de la surface non active n'induisent pas d'effets cytopathogènes sur les cellules MRC5 pour des temps de contact de 5, 15 et 60 minutes

Les résultats de l'essai sont dépendants et tiennent compte des résultats de cytotoxicité.

c. Essai

Les données brutes d'évaluation de l'activité virucide de la surface Agivir après 5000 cycles martindale et de la surface non active sur le coronavirus humain HCoV-229E dans les conditions de l'essai (20°C, 5, 15 et 60 minutes, Interférences Mucus/salive) sont présentées en annexe.

Les résultats ont été déterminés par lecture visuelle des effets cytopathogènes (ECP) par microscopie et quantifiés par DICT50 sur les cellules permissives MRC5.

Surface	Condition d'interférence	Cytotoxicité (log ₁₀ DICT50)	Support	T0 (log ₁₀ DICT50)	T5 (log ₁₀ DICT50)	T15 (log ₁₀ DICT50)	T60 (log ₁₀ DICT50)
Surface non active	Mucus/salive	0.5	S1	4,7	5	4,5	4,3
			S2	4,5	4,7	4,7	4,3
			S3	5	4,7	4,5	4,5
			<i>moyenne N1'</i>	4,73	4,80	4,57	4,37
			<i>SD</i>	0,18	0,13	0,09	0,09
Agivir après 5000 cycles martindale	Mucus/salive	0.5	S1	5	2,7	1,3	0,5
			S2	4,7	2,5	1,3	0,5
			S3	4,5	2,7	1	0,5
			<i>moyenne N2'</i>	4,73	2,63	1,20	0,50
			<i>SD</i>	0,18	0,09	0,13	0,00
			Abattement D2 (log DICT50)*	/	2,17	3,37	3,87

N1': quantité moyenne en log₁₀ de virus (triplicata) surface non active (mucus/salive)

N2': quantité moyenne en log₁₀ de virus (triplicata) surface Agivir après 5000 cycles martindale (mucus/salive)

* D2 : abattement d'efficacité virucide pour chaque temps de contact (log₁₀)

$D2 = N1' - N2'$

V. CONCLUSION

La surface Agivir après 5000 cycles martindale présente des efficacités virucides de 99.32% (2.17 log₁₀ DICT₅₀), 99.96% (3.37 log₁₀ DICT₅₀) et 99.99% (3.87 log₁₀ DICT₅₀) sur le coronavirus humain HCoV-229E respectivement après un temps de contact de 5,15 et 60 minutes en présence d'une solution interférente saline/mucus.

VI. ANNEXES

V.1 Matériels et réactifs

- Lignée cellulaire

Nom: MRC5 ATCC® CCL-171™

Nombre de passages: 15

Milieu de culture: EMEM (Lonza, lot n°0000757679, 11/2020) avec 10% of SVF (Dutscher, lot n° S16529S1810, 09/2022), 1% d'antibiotics (Gibco, lot n° 2145466, 12/2020) et 1% de L-glutamine (Gibco, lot n° 2091579, 22/2021)

- Souche virale

Nom: human coronavirus 229E ATCC® VR-740™

Suspension virale : 2.37×10^7 (numéro de lot: 032020229-4)

Technique de quantification:

- Dilutions sériées dans du milieu d'infection: EMEM (Lonza, lot n°0000757679, 11/2020) avec 2% of SVF (Dutscher, lot n° S16529S1810, 09/2022), 1% d'antibiotics (Gibco, lot n° 2145466, 12/2020) et 1% de L-glutamine (Gibco, lot n° 2091579, 22/2021)
- Ajouter 100uL de chaque solution dans une plaque 96 puits à raison de 8 puits par dilution.
- Incuber 7 jours à 34°C

V.2 Préparation des réactifs

- Mélanger 1mL de salive artificielle (ASTM 2721) avec 1mL de mucus d'épithélium nasaux (Epi 118, EPITHELIX)

V.3 Données brutes : Quantification en DICT50/mL du coronavirus 229E avec un temps de contact de 5,15 et 60 minutes après lecture visuelle au microscope des effets cytopathogènes (4 puits/dilution)

• Tableau 1 : Témoins d'arrêt d'activité

	Produit	Substance interférente	Temps de contact (min)	dilutions (-log)							
				p	1	2	3	4	5	6	7
T0	surface non active	mucus / salive	0	4	4	4	4	1	0	0	0
			0	4	4	4	3	1	0	0	0
			0	4	4	4	4	2	0	0	0
	Agivir + 5000 martindale		0	4	4	4	4	2	0	0	0
			0	4	4	4	3	2	0	0	0
			0	4	4	4	3	1	0	0	0

Explications :

1-4 : degrés des ECP dans 4 unités de culture cellulaire (plaque de microtitration)

0 : aucun ECP

C : observation de cytotoxicité sur les cellules

n.d : non déterminé

• Tableau 2 : Témoins de cytotoxicité

	Produit	Substance interférente	Temps de contact (min)	dilutions (-log)							
				p	1	2	3	4	5	6	7
cytotoxicité	surface non active	mucus / salive	5	0	0	0	0	0	0	0	0
			15	0	0	0	0	0	0	0	0
			60	0	0	0	0	0	0	0	0
	Agivir + 5000 martindale		5	0	0	0	0	0	0	0	0
			15	0	0	0	0	0	0	0	0
			60	0	0	0	0	0	0	0	0

Explications :

1-4 : degrés des ECP dans 4 unités de culture cellulaire (plaque de microtitration)

0 : aucun ECP

C : observation de cytotoxicité sur les cellules

n.d : non déterminé

• Tableau 3 : essai

	Produit	Substance interférente	Temps de contact (min)	dilutions (-log)								
				p	1	2	3	4	5	6	7	
Essais	surface non active	mucus / salive	5	4	4	4	4	2	0	0	0	
			5	4	4	4	4	1	0	0	0	
			5	4	4	4	4	1	0	0	0	
	15		4	4	4	4	0	0	0	0		
	15		4	4	4	4	1	0	0	0		
	15		4	4	4	4	0	0	0	0		
	surface non active	mucus / salive	60	4	4	4	3	0	0	0	0	
			60	4	4	4	3	0	0	0	0	
			60	4	4	4	4	0	0	0	0	
	surface non active		mucus / salive	5	4	4	1	0	0	0	0	0
				5	4	4	0	0	0	0	0	0
				5	4	4	1	0	0	0	0	0
	Agivir + 5000 martindale	mucus / salive		15	3	0	0	0	0	0	0	0
				15	2	1	0	0	0	0	0	0
				15	2	0	0	0	0	0	0	0
	Agivir + 5000 martindale		mucus / salive	60	0	0	0	0	0	0	0	0
				60	0	0	0	0	0	0	0	0
				60	0	0	0	0	0	0	0	0

Explications :

1-4 : degrés des ECP dans 4 unités de culture cellulaire (plaque de microtitration)

0 : aucun ECP

C : observation de cytotoxicité sur les cellules

n.d : non déterminé

R2006BFER003

Détermination de l'activité virucide de la surface Agivir après 500 passages de javel à 2,5% sur le coronavirus humain HCoV-229E pour des temps de contact de 5, 15 et 60 minutes.

Protocole adapté de la norme ISO 21702 (2019)

CLIENT	Mme Valérie Courault SERGE FERRARI BP54, 38352 La Tour-Du-Pin cedex, France
PRESTATION EFFECTUÉE PAR	S.A.S VIRHEALTH Site Laennec-La Buire, 2ème étage, Bat B 7-11 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 08
CONTRIBUTION TECHNIQUE	Léa Szpiro, responsable laboratoire Dounia Bouchami, technicienne de laboratoire

Approbateur/Validation Qualité

Nom : Dr Vincent Moulès, Directeur Général

Date : Lyon, le 08/06/2020

Signature :



VirHealth
RTM Laennec
7-11 rue Paradin, 69008 Lyon
France

Ce rapport d'essai comporte 10 pages

SOMMAIRE

I.	CONCLUSION	3
II.	DOCUMENTS CONTRACTUELS	4
III.	DONNÉES CONCERNANT LES ÉCHANTILLONS ET LES CONDITIONS D'ESSAI	4
III.1	IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS.....	4
III.2	CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	5
IV.	RÉSULTATS	6
	ACTIVITE VIRUCIDE DE LA SURFACE AGIVIR + 500 PASSAGES JAVEL 2,5% SUR LE CORONAVIRUS HUMAIN HCoV-229E POUR DES TEMPS DE CONTACT DE 5, 15 ET 60 MINUTES	6
a.	<i>Sensibilité cellulaire</i>	6
b.	<i>Détermination de la cytotoxicité</i>	6
c.	<i>Essai</i>	7
V.	CONCLUSION.....	7
VI.	ANNEXES	8
V.1	MATERIELS ET REACTIFS.....	8
V.2	PREPARATION DES REACTIFS	8
V.3	DONNEES BRUTES : QUANTIFICATION EN DICT50/ML DU CORONAVIRUS 229E AVEC UN TEMPS DE CONTACT DE 5,15 ET 60 MINUTES APRES LECTURE VISUELLE AU MICROSCOPE DES EFFETS CYTOPATHOGENES (4 PUITS/DILUTION).....	9

I. CONCLUSION

Les activités virucides de la surface Agivir ayant reçue 500 passages de javel à 2,5% et de la surface non active ont été évaluées selon un protocole adapté de la norme 21702 (2019) pour des temps de contact de 5, 15 et 60 min sur le coronavirus humain HCov-229E en présence d'interférence correspondant à un mélange artificiel mucus/salive.

La surface non active est la surface de référence pour l'essai.

- Surface Agivir + 500 passages javel 2,5%, 5 minutes de temps de contact

Dans les conditions expérimentales, (20°C, 5 minutes, Interférence Mucus/salive), la membrane Agivir + 500 passages javel 2,5% montre une activité virucide associée à une réduction moyenne logarithmique de 0.90 log₁₀ correspondant à une efficacité de 87.41% selon le protocole adapté de la norme ISO 21702

- Surface Agivir + 500 passages javel 2,5%, 15 minutes de temps de contact

Dans les conditions expérimentales, (20°C, 15 minutes, Interférence Mucus/salive), la membrane Agivir + 500 passages javel 2,5% montre une activité virucide associée à une réduction moyenne logarithmique de 1.47 log₁₀ correspondant à une efficacité de 96.61% selon le protocole adapté de la norme ISO 21702.

- Surface Agivir + 500 passages javel 2,5%, 60 minutes de temps de contact

Dans les conditions expérimentales, (20°C, 60minutes, Interférence Mucus/salive), la membrane Agivir + 500 passages javel 2,5% montre une activité virucide associée à une réduction moyenne logarithmique de 1.93 log₁₀ correspondant à une efficacité de 98.85% selon le protocole adapté de la norme ISO 21702.

PRODUIT	Temps de contact (min)	Substance interférente	Réduction logarithmique (Log10)	Efficacité virucide (%)
Agivir + 500 passages javel 2,5%	5	Mucus/salive	0.90	87.41%
	15		1.47	96.61%
	60		1.93	98.85%

II. DOCUMENTS CONTRACTUELS

La présente prestation est définie par les documents suivants :

. Devis	DEV0010
. Commande	Bon pour accord en date du 15/05/2020

III. DONNÉES CONCERNANT LES ÉCHANTILLONS ET LES CONDITIONS D'ESSAI

III.1 Identification des échantillons

Surface d'essai : surface Agivir + 500 passages javel 2,5%

Surface témoin : surface non active

Aspect du produit fourni : blanc, lisse et non-poreux

Fabricant : SERGE FERRARI

Fournisseur : SERGE FERRARI

Condition de stockage : température ambiante

Période d'évaluation : 05/2020

III.2 Conditions expérimentales

Surface d'essai : Surface Agivir + 500 passages javel 2,5%,

Conditions expérimentales	
Date	- 27/05/2020
Souche virale	- Human coronavirus HCoV-229E
Surface des échantillons (cm ²)	- 1.5 cm x 1.5 cm = 2.25 cm ²
Surface de l'inoculum (cm ²)	- 1 cm x 1 cm = 1cm ²
Volume de l'inoculum	- 50uL
Température	20°C
Substance interférente	Mucus/salive
Temps de contact	5, 15 et 60 minutes
Neutralisation	- 2 mL de milieu d'infection sans SVF
Quantification	-Titration limite sur cellules permissives
Nombre de puits par dilution	4
Température d'incubation	34 ± 1 °C

IV. RÉSULTATS

Activité virucide de la surface Agivir + 500 passages javel 2,5% sur le coronavirus humain HCoV-229E pour des temps de contact de 5, 15 et 60 minutes

a. Sensibilité cellulaire

Surface	LOG TCID50/mL
Surface Agivir + 500 passages javel 2,5%	6.3
Surface non active	5.7
Différence < 1 log <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> no	

Le titrage comparatif du coronavirus humain HCoV-229E sur les cellules MRC5 inoculées avec les tampons de reprise de la surface Agivir + 500 passages javel 2,5%, et de la surface non active a pour résultat une différence inférieure à 1 log₁₀. Les résultats montrent que les liquides de récupération des surfaces d'essais n'affectent pas la sensibilité des cellules MRC5 au coronavirus humain HCoV-229-E dans la procédure expérimentale utilisée.

b. Détermination de la cytotoxicité

La cytotoxicité des surfaces d'essai est déterminée par lecture visuelle des effets cytopathogènes (ECP) par microscopie et quantifiée par DICT50 sur les cellules permissives MRC5.

Pour la récupération du virus sur surface, les membranes sont immergées dans un volume de 2mL de milieu d'infection sans SVF (solution de récupération). La cytotoxicité des solutions de récupération est déterminée par lecture visuelle des ECP.

Dans les conditions de l'essai, en présence de la substance interférente (Mucus/salive) les solutions de récupération de la surface Agivir + 500 passages javel 2,5% et de la surface non active n'induisent pas d'effets cytopathogènes sur les cellules MRC5 pour des temps de contact de 5, 15 et 60 minutes

Les résultats de l'essai sont dépendants et tiennent compte des résultats de cytotoxicité.

c. Essai

Les données brutes d'évaluation de l'activité virucide de la surface Agivir + 500 passages javel 2,5% et de la surface non active sur le coronavirus humain HCoV-229E dans les conditions de l'essai (20°C, 5, 15 et 60 minutes, Interférences Mucus/salive) sont présentées en annexe.

Les résultats ont été déterminés par lecture visuelle des effets cytopathogènes (ECP) par microscopie et quantifiés par DICT50 sur les cellules permissives MRC5.

Surface	Condition d'interférence	Cytotoxicité (log10 DICT50)	Support	T0 (log10 DICT50)	T5 (log10 DICT50)	T15 (log10 DICT50)	T60 (log10 DICT50)
Surface non active	Mucus/salive	0.5	S1	4,7	5	4,5	4,3
			S2	4,5	4,7	4,7	4,3
			S3	5	4,7	4,5	4,5
			Moyenne N1'	4,73	4,80	4,57	4,37
			SD	0,18	0,13	0,09	0,09
Agivir + 500 passages javel 2,5%	Mucus/salive	0.5	S1	4,7	3,7	3,3	2,5
			S2	5	4	3	2,3
			S3	4,7	4	3	2,5
			Moyenne N2'	4,80	3,90	3,10	2,43
			SD	0,13	0,13	0,13	0,09
			Abattement D2 (log DICT50)*	/	0,90	1,47	1,93

N1': quantité moyenne en log10 de virus (triplicata) surface non active (mucus/salive)

N2': quantité moyenne en log10 de virus (triplicata) surface Agivir + 500 passages javel 2,5% (mucus/salive)

* D2 : abattement d'efficacité virucide pour chaque temps de contact (log10)

$D2 = N1' - N2'$

V. CONCLUSION

La surface Agivir + 500 passages javel 2,5% présente des efficacités virucides de 87.41% (0.90 log10 DICT₅₀), 96.61% (1.47 log10 DICT₅₀) et 98.85% (1.93 log10 DICT₅₀) sur le coronavirus humain HCoV-229E respectivement après un temps de contact de 5,15 et 60 minutes en présence d'une solution interférente salive/mucus.

VI. ANNEXES

V.1 Matériels et réactifs

- Lignée cellulaire

Nom: MRC5 ATCC® CCL-171™

Nombre de passages: 15

Milieu de culture: EMEM (Lonza, lot n°0000757679, 11/2020) avec 10% of SVF (Dutscher, lot n° S16529S1810, 09/2022), 1% d'antibiotics (Gibco, lot n° 2145466, 12/2020) et 1% de L-glutamine (Gibco, lot n° 2091579, 22/2021)

- Souche virale

Nom: human coronavirus 229E ATCC® VR-740™

Suspension virale : 2.37×10^7 (numéro de lot: 032020229-4)

Technique de quantification:

- Dilutions sériées dans du milieu d'infection: EMEM (Lonza, lot n°0000757679, 11/2020) avec 2% of SVF (Dutscher, lot n° S16529S1810, 09/2022), 1% d'antibiotics (Gibco, lot n° 2145466, 12/2020) et 1% de L-glutamine (Gibco, lot n° 2091579, 22/2021)
- Ajouter 100uL de chaque solution dans une plaque 96 puits à raison de 8 puits par dilution.
- Incuber 7 jours à 34°C

V.2 Préparation des réactifs

- Mélanger 1mL de salive artificielle (ASTM 2721) avec 1mL de mucus d'épithélium nasaux (Epi 118, EPITHELIX)

V.3 Données brutes : Quantification en DICT50/mL du coronavirus 229E avec un temps de contact de 5,15 et 60 minutes après lecture visuelle au microscope des effets cytopathogènes (4 puits/dilution)

• Tableau 1 : Témoins d'arrêt d'activité

	Produit	Substance interférente	Temps de contact (min)	dilutions (-log)							
				p	1	2	3	4	5	6	7
TO	surface non active	mucus / salive	0	4	4	4	4	1	0	0	0
			0	4	4	4	3	1	0	0	0
			0	4	4	4	4	2	0	0	0
			0	4	4	4	4	1	0	0	0
	Agivir 500 passages javel		0	4	4	4	4	1	0	0	0
			0	4	4	4	4	2	0	0	0
			0	4	4	4	4	1	0	0	0
			0	4	4	4	4	2	0	0	0

Explications :

1-4 : degrés des ECP dans 4 unités de culture cellulaire (plaque de microtitration)

0 : aucun ECP

C : observation de cytotoxicité sur les cellules

n.d : non déterminé

• Tableau 2 : Témoins de cytotoxicité

	Produit	Substance interférente	Temps de contact (min)	dilutions (-log)							
				p	1	2	3	4	5	6	7
cytotoxicity	surface non active	mucus / salive	5	0	0	0	0	0	0	0	0
			15	0	0	0	0	0	0	0	0
			60	0	0	0	0	0	0	0	0
			5	0	0	0	0	0	0	0	0
	Agivir 500 passages javel		15	0	0	0	0	0	0	0	0
			60	0	0	0	0	0	0	0	0
			5	0	0	0	0	0	0	0	0
			15	0	0	0	0	0	0	0	0

Explications :

1-4 : degrés des ECP dans 4 unités de culture cellulaire (plaque de microtitration)

0 : aucun ECP

C : observation de cytotoxicité sur les cellules

n.d : non déterminé

• Tableau 3 : essai

	Produit	Substance interférente	Temps de contact (min)	dilutions (-log)							
				p	1	2	3	4	5	6	7
Essais	surface non active	mucus / salive	5	4	4	4	4	2	0	0	0
			5	4	4	4	4	1	0	0	0
			5	4	4	4	4	1	0	0	0
	15		4	4	4	4	0	0	0	0	
	15		4	4	4	4	1	0	0	0	
	15		4	4	4	4	0	0	0	0	
	60		4	4	4	3	0	0	0	0	
	60		4	4	4	3	0	0	0	0	
	60		4	4	4	4	0	0	0	0	
	surface non active	mucus / salive	5	4	4	4	1	0	0	0	0
			5	4	4	4	2	0	0	0	0
			5	4	4	4	2	0	0	0	0
	15		4	4	3	0	0	0	0	0	
	15		4	4	2	0	0	0	0	0	
	15		4	4	2	0	0	0	0	0	
	60		4	4	0	0	0	0	0	0	
	60		4	3	0	0	0	0	0	0	
	60		4	4	0	0	0	0	0	0	
	AgiVir 500 passages javel	mucus / salive	5	4	4	4	1	0	0	0	0
			5	4	4	4	2	0	0	0	0
			5	4	4	4	2	0	0	0	0
	15		4	4	3	0	0	0	0	0	
	15		4	4	2	0	0	0	0	0	
	15		4	4	2	0	0	0	0	0	
60	4		4	0	0	0	0	0	0		
60	4		3	0	0	0	0	0	0		
60	4		4	0	0	0	0	0	0		

Explications :
 1-4 : degrés des ECP dans 4 unités de culture cellulaire (plaque de microtitration)
 0 : aucun ECP
 C : observation de cytotoxicité sur les cellules
 n.d : non déterminé

TITLE: OECD TG 439 skin irritation classification of AGIVIR extract

STUDY PROTOCOL N°

PS 66-20

STUDY DIRECTOR

PAOLO BURATTI

SPONSOR**SERGE FERRARI**
BP 54 - 38352
La Tour-du-Pin Cedex
France**GLP TESTING FACILITY****VitroScreen Srl**
Via Mosè Bianchi,103
20149 Milano (Italia)

TITLE: OECD TG 439 skin irritation classification of AGIVIR extract

INDEX

1. INTRODUCTION AND AIM OF THE STUDY3
2. RESULTS AND REGULATORY CLASSIFICATION3
3. REFERENCES3
4. SIGNATURES4

TITLE: OECD TG 439 skin irritation classification of AGIVIR extract

1. INTRODUCTION AND AIM OF THE STUDY

This Resume was required by the Sponsor and it faithfully reports the results obtained in the GLP Study Report RS 66-20 including the Quality Assurance Statement: it belongs to **Serge Ferrari S. A. S.**

The aim of the study was to assess the skin irritation potential of **AGIVIR** a new composite membrane including a biocide, tested as an extract, eluate in saline solution, in compliance with OECD 439 and using the EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT) adopting the specific procedure for liquids.

2. RESULTS AND REGULATORY CLASSIFICATION

Skin irritation was assessed after 35 minutes exposure followed by 25 minutes exposure at room temperature, product washing and 42 hours of post-exposure incubation.

The viability of the EpiDerm™ tissue was measured by MTT in comparison to tissues treated with negative control substance (% viability).

According to MTT results (100.00%) and prediction model the test item was classified as reported in the following table.

TEST ITEM	UN GHS CLASSIFICATION
AGIVIR extract in saline solution	No Category NON IRRITANT FOR THE SKIN

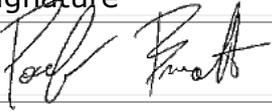
3. REFERENCES

- **OECD TG 439:** *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human *Epidermis* Test Method. June 2019.
- MatTek Protocol *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (**EPI-200-SIT**) (10/02/2019).

TITLE: OECD TG 439 skin irritation classification of AGIVIR extract

4. SIGNATURES

The following persons were responsible for key elements of the study within VitroScreen Laboratories:

Name - Surname - Function	Signature
Paolo Buratti Study Director	 Date: 26/06/2020
Euridice Santirocco Quality Assurance	 Date: 26/06/2020
Marisa Meloni Testing Facility Director	 Date: 26/06/2020

7 juillet 2020

DIRECTIVE BIOCIDÉ BPR article 58 et 94 de la réglementation N°528/2012

Cette directive européenne gère tous les aspects liés aux biocides dans tous les pays européens.

Le but de la BPR est de protéger chaque individu, l'environnement et la santé publique.

Il existe trois types de produits au sens de la BPR :

	Active Substance	Biocidal Product	Treated Article
Definition	A chemical and natura substances or microorganisms that have the effect or property of eliminating, controlling, rendering harmless or deterring harmful organism	A product that has the primary purpose of eliminating harmful organisms A product consists of one or more biocidal substances, a mixture with biocidal substance from contained mixture of chemical substances	Any substance, mixture or article which has been treated with, or which works as biocidal products for the purpose of eliminating harmful organisms, but it is not main purpose of product.
Example	PHMG, PGH, CMIT/MIT,OIT etc. OIT substance as itself	Disinfectants, Insecticides, Repellents, Preservatives, Humidifier disinfectants, Ozone / ion generator Preservative product contains OIT as active substance.	Antibacterial air conditioner filter, deodorant socks, furntiure treated with preservative, any products contain preservative Air conditional filter treated with OIT as preservative
			

Les substances actives doivent être enregistrées par les fabricants ou les distributeurs. Il faut un dossier d'efficacité et de toxicologique. L'étude de ce dossier prend plusieurs années. A la fin de cette étude :

- Soit la substance active est autorisée avec éventuellement des restrictions d'usage ou des étiquetages particuliers
- Soit la substance est interdite

Les produits biocides, ils utilisent une substance active. Selon le degré d'avancement de l'enregistrement de la substance active qu'ils utilisent les procédures sont différentes :

-si l'enregistrement est finalisé pour la substance, il faut enregistrer les produits biocide au niveau européens avec un dossier technique complet.

-si la substance active est encore à l'étude, les procédures d'enregistrement pour les produits qui l'utilisent sont au niveau national pour chaque pays de l'union (cas pour gamme agivir).

Les articles traités, ils utilisent aussi une substances active qui doit être enregistrée ou en cours d'enregistrement. La seule obligation pour ces articles est d'informer les clients du nom de la substance active si on revendique des propriétés biocides.

Ex pour agivir :

Pour les articles, qui ont plusieurs fonctions, dont l'une est d'être biocide pour savoir il faut les classer en produits biocides ou en articles traités, il faut regarder si la fonction biocide est primaire ou non.

Si elle est primaire c'est un biocide, si elle n'est pas primaire c'est un article traité.

La fonction est plutôt primaire si :

- elle est le but de l'article
- la fonction biocide est d'importance ou de valeur plus grande que les autres fonctions de l'article
- c'est la seule de l'article
- les revendications sont identiques à celles de biocides existants
- la cible de microbes n'est pas dangereuse pour l'article lui-même
- la concentration en produit actif est identique à des biocides existants
- le mode d'action de l'article est identique à un biocide existant
- les revendications biocides sont plus mises en avant que les autres propriétés du matériau
- si les revendications ont trait à la santé publique
- si la durée de vie de la fonction biocide est identique à celle de la membrane.
- la communication faite sur la fonction biocide est plus importante que la communication sur les autres fonctions de la membrane.

Concernant la publicité elle est réglementée pour les **produits biocides** :

- Nous n'avons pas le droit d'écrire « produits biocide à faible risque », « non toxique », « ne nuit pas à la santé » ou toute autre indication de ce style.
- Toute documentation doit comporter la mention :« **utilisez les virucides avec précaution. Avant toute utilisation, lisez l'étiquette et les informations concernant le produit** »

Le choix entre produit biocide et article traité est à faire pour chaque produit selon ce qui est annoncé et en pesant au cas par cas les points ci-dessus.

Il faut prouver par la communication que la fonction biocide est secondaire en :

-ne faisant pas de revendications de santé publique comme :

- nos produits participent à la limitation de la pandémie
- nos produits réduisent le risque de maladies nosocomiales
- dans la lutte contre les coronas virus...
- une large gamme permettant de lutter contre la pandémie actuelle....

-Les plaquettes doivent mettre en avant, EN PREMIER et EN GROS la fonction primaire de l'article

-l'argument biocide doit être secondaire dans les plaquettes, la fonction virucide ou bactéricide ne doit être qu'une ligne parmi d'autres dans la fiche technique. Plus il y aura d'autres propriétés/fonctions mieux ça sera.

-il faut éviter de parler du mode d'action biocide

-il faut garantir moins longtemps la fonction biocide que la membrane elle-même. Cet argument est très important pour le classement en article traité car il exclut le fait que la fonction primaire puisse être le biocide. Ça peut être pénalisant commercialement mais c'est un argument fort pour prouver que la fonction biocide est secondaire.

Dans tous les cas la responsabilité du choix de la catégorie de l'article est de la responsabilité de celui qui le commercialise. L'ANSES est l'organisme français officiellement représentant de l'Europe pour la directive biocide, on peut poser des questions via helpdesk biocides si on a un doute sur la classification : helpdesk-biocides@anses.fr