

**R2007FER001**

Détermination de l'activité antivirale de la surface Agivir sur le coronavirus Sars-Cov-2 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 08/07/2020

Signature :



VirHealth  
RTH Laennec  
7-11 rue G. Paradin, 69008 Lyon  
France

Ce rapport d'essai comporte 9 pages

## SOMMAIRE

<b>I. CONCLUSION .....</b>	<b>3</b>
<b>II. DOCUMENTS CONTRACTUELS .....</b>	<b>4</b>
<b>III. DONNÉES CONCERNANT LES ÉCHANTILLONS ET LES CONDITIONS D’ESSAI .....</b>	<b>4</b>
III.1 IDENTIFICATION DES ECHANTILLONS.....	4
III.2 CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	5
<b>IV. RÉSULTATS .....</b>	<b>6</b>
ACTIVITE ANTIVIRALE DE LA SURFACE AGIVIR SUR LE CORONAVIRUS SARS-COV-2 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>
<b>V. CONCLUSION.....</b>	<b>7</b>
<b>VI. ANNEXES .....</b>	<b>8</b>
V.1 MATERIELS ET REACTIFS.....	8
V.2 PREPARATION DES REACTIFS .....	8
V.3 DONNEES BRUTES : QUANTIFICATION EN DICT50/ML DU CORONAVIRUS SARS-COV2 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 antivirales de la surface Agivir 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 Sars-Cov-2 en présence d'un mélange artificiel mucus/salive.

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

- Surface Agivir, 5 minutes de temps de contact

Dans les conditions expérimentales, (20°C, 5 minutes, interférence Mucus/salive), la surface Agivir montre une activité antivirale associée à une réduction moyenne logarithmique de  $0.83 \log_{10}$  correspondant à une efficacité de 85.21% selon le protocole adapté de la norme ISO 21702.

- Surface Agivir, 15 minutes de temps de contact

Dans les conditions expérimentales, (20°C, 15 minutes, interférence Mucus/salive), la surface Agivir montre une activité antivirale associée à une réduction moyenne logarithmique de  $1.10 \log_{10}$  correspondant à une efficacité de 92.06% selon le protocole adapté de la norme ISO 21702.

- Surface Agivir, 60 minutes de temps de contact

Dans les conditions expérimentales, (20°C, 60 minutes, interférence Mucus/salive), la surface Agivir montre une activité antivirale associée à une réduction moyenne logarithmique de  $1.70 \log_{10}$  correspondant à une efficacité de 98.00% selon le protocole adapté de la norme ISO 21702.



### III.2 Conditions expérimentales

Surface d'essai : surface Agivir

Conditions expérimentales	
Date	- 03/07/2020
Souche virale	- coronavirus Sars-Cov-2
Surface des échantillons (cm <sup>2</sup> )	- 1.5 cm x 1.5 cm = 2.25 cm <sup>2</sup>
Surface de l'inoculum (cm <sup>2</sup> )	- 1 cm x 1 cm = 1cm <sup>2</sup>
Volume de l'inoculum	- 50uL
Température	20°C
Humidité relative HR	39%
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	37 ± 1 °C

## IV. RÉSULTATS

Activité antivirale de la surface Agivir sur le coronavirus Sars-Cov-2 pour des temps de contact de 5, 15 et 60 minutes

### a. Sensibilité cellulaire

Surface	LOG TCID50/mL
Agivir	4.7
Surface non active	4.7
Différence < 1 log <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> no	

Le titrage comparatif du coronavirus Sars-Cov-2 sur les cellules Vero E6 inoculées avec les tampons de reprise de la surface Agivir et de la surface non active a pour résultat une différence inférieure à 1 log<sub>10</sub>. Les résultats montrent que les liquides de récupération des surfaces d'essais n'affectent pas la sensibilité des cellules Vero E6 au coronavirus Sars-Cov-2 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 Vero E6

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 et de la surface non active n'induisent pas d'effets cytopathogènes sur les cellules Vero E6 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 antivirale de la surface Agivir et de la surface non active sur le coronavirus Sars-Cov-2 dans les conditions de l'essai (20°C, 5, 15 et 60 minutes, interférence Mucus/salive) sont présentées en annexes.

Les résultats ont été déterminés par lecture visuelle des effets cytopathogènes (ECP) par microscopie et quantifiés par DICT50 sur les cellules permissives Vero E6.

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	4,5	4,7	4,3	4,7
			S2	4,7	4,5	4,5	4,5
			S3	4,5	4,3	4,5	4,3
			Moyenne N1	<b>4,57</b>	<b>4,50</b>	<b>4,43</b>	<b>4,50</b>
			SD	0,09	0,13	0,09	0,13
Agivir	Mucus/salive	0.5	S1	4,5	4	3	2,7
			S2	4,5	3,5	3,5	2,7
			S3	5	3,5	3,5	3
			Moyenne N2	<b>4,67</b>	<b>3,67</b>	<b>3,33</b>	<b>2,80</b>
			SD	0,22	0,22	0,22	0,13
			Abattement D1 (log DICT50)*	/	<b>0,83</b>	<b>1,10</b>	<b>1,70</b>

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

*N2: quantité moyenne en log10 de virus (triplicata) surface Agivir (mucus/salive)*

*\*D1: abattements d'efficacité antivirale pour chaque temps de contact (log10)*

*D1=N1-N2*

## V. CONCLUSION

La surface Agivir présente des efficacités antivirales de 85.21% (0.83 log10 DICT<sub>50</sub>), 92.06% (1.10 log10 DICT<sub>50</sub>) et 98.00% (1.70 log10 DICT<sub>50</sub>) sur le coronavirus Sars-Cov-2 respectivement après des temps de contact de 5, 15 et 60 minutes en présence de solution interférente salive/mucus.

## VI. ANNEXES

### V.1 Matériels et réactifs

- Lignée cellulaire

Nom: Cellules Vero E6 ATCC CRL-1586

Nombre de passages : 17

Milieu de culture : DMEM 4,5g/L (Lonza) complétementé avec du SVF 10% (Dutscher), 1% d'antibiotiques (Lonza) et 1% de L-glutamine (Lonza)

- Souche virale

Nom : coronavirus Humain SARS-CoV2 (BetaCoV/France/IDF0571/2020)

Suspension virale mère :  $10^{7.63}$  Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> (Numéro du lot: 062020CoV2-1)

Méthode de quantification :

- Réalisation des dilutions dans du milieu d'infection DMEM 4.5g/L (Lonza) complétementé avec 1% d'antibiotiques (Lonza) et 1% de L-glutamine (Lonza)
- Dépôt de 50µL de chaque dilution dans 4 puits des 96 microplaques de culture cellulaire
- Incubation 3-4 jours à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>

### 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 SARS-CoV2 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	4	0	0	0	0
			0	4	4	4	4	1	0	0	0	
			0	4	4	4	4	0	0	0	0	
	Agivir		0	4	4	4	3	1	0	0	0	
			0	4	4	4	4	0	0	0	0	
			0	4	4	4	4	2	0	0	0	

Explications :

1-4 : degrés des ECP dans 8 unités de culture cellulaire (plaque de microtitration)

0 : aucun ECP

C : observation de cytotoxicité sur les cellules

n.d : non déterminé

• Tableau 2 : 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	0
			15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			60	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Agivir		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			60	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Explications :

1-4 : degrés des ECP dans 8 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	3	2	0	0	0
			5	4	4	4	3	1	0	0	0
			5	4	4	4	2	1	0	0	0
	surface non active		15	4	4	4	2	1	0	0	0
			15	4	4	4	3	1	0	0	0
			15	4	4	4	3	1	0	0	0
	surface non active	60	4	4	4	4	1	0	0	0	
		60	4	4	4	2	1	0	0	0	
		60	4	4	4	3	1	0	0	0	
	Agivir	mucus / salive	5	4	4	4	2	0	0	0	0
			5	4	4	3	1	0	0	0	0
			5	4	4	3	1	0	0	0	0
	Agivir		15	4	4	2	0	0	0	0	0
			15	4	4	4	0	0	0	0	0
			15	4	4	4	0	0	0	0	0
	Agivir	mucus / salive	60	4	3	2	0	0	0	0	0
			60	4	4	1	0	0	0	0	0
			60	4	4	2	0	0	0	0	0

Explications :

1-4 : degrés des ECP dans 8 unités de culture cellulaire (plaque de microtitration)

0 : aucun ECP

C : observation de cytotoxicité sur les cellules

n.d : non déterminé