



Toulouse, 4 Février 2021

ETUDE 20-2818/3
RAPPORT N°21-1634

**MESURE DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE VIS-A-VIS DU CORONAVIRUS HUMAIN
229 E SUR LES MATIERES PLASTIQUES ET AUTRES SURFACES NON
POREUSES SELON LA METHODOLOGIE DE LA NORME ISO 21702 (MAI 2019)**

Client

NEOTENY / (주)네오테니
8th Floor, Seoul Finance Center,
136, Sejong-daero, Jung-gu,
04520 Seoul, Republic of Korea

Laboratoire d'essai FONDEREPHAR
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35 Chemin des Maraîchers
31062 TOULOUSE cedex 9
FRANCE

Dr Laila HADDIOUI
Responsables Etudes

Dr Jocelyne BACARIA
Responsable Qualité

I- IDENTIFICATION DU LABORATOIRE D'ESSAI

FONDEREPHAR

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

II - IDENTIFICATION DE L'ECHANTILLON

- Nom du support: PROMAXSILVER-ACLIVSilver PET
 - Lot numéro: 200606-04
 - Date de réception: 26/11/2020
 - Code interne: 20-2818-3

- Nom du support: TEMOIN PET
 - Lot numéro: Non communiqué
 - Date de réception: 26/11/2020
 - Code interne: 20-2818-6

- Fournisseur: .-NEOTENY

- Période d'essai : Janvier 2021

III - METHODE D'ESSAI

III-1 Virus

Dénomination: HCOV 229 E
 Origine: ATCC
 Référence: VR-740
 Numéro de lot ATCC: 58505270
 Numéro de lot interne: SS-2-210920 (Passage N° 2)

III-2- Cellules réceptrices

Dénomination: VERO
 Origine: ATCC
 Référence: CCL-81
 Numéro de lot ATCC: 3372621
 Numéro de lot interne: WCB-090708 (Passage N° 20 et 27)

IV - CONDITIONS D'ESSAI

- Temps de contact : 30 minutes, 1 heure et 24 heures
- Température de l'essai : $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

V- METHODE D'ESSAI

V-1 Contrôle de la cytotoxicité

2.5 ml de milieu neutralisant sont ajoutés à 3 échantillons non traités et à 3 échantillons traités. Les échantillons sont lavés 4 fois par le milieu neutralisant.

Des dilutions sériées de raison 10 sont réalisées pour contrôler l'absence de cytotoxicité cellulaire.

V-2 Vérification de la sensibilité des cellules au virus et l'arrêt de l'activité antivirale

2.5 ml de milieu neutralisant sont ajoutés à 3 échantillons non traités et à 3 échantillons traités.

Les échantillons sont lavés 4 fois par le milieu neutralisant. Ensuite 1.98 ml de milieu de récupération sont mis en contact avec 20 μl de la suspension de virus préparée à la concentration de 4 à 6.10^5 DICT50/ml.

Après une incubation à 25°C pendant 30 min les tubes sont maintenus dans la glace avant le titrage virale.

V-3 Mise en contact virus / surface

- Chaque échantillon de surface 5 cm x 5 cm (échantillons témoin et d'essai) est déposé dans une boîte de Petri en verre stérile

- 400 μl de la suspension virale sont déposés sur chaque surface et étalées sur 16 cm^2 à l'aide d'un film de 4 x 4 cm qui permet de réduire la dessiccation de l'inoculum.

V-4 Récupération du film viral

Après incubation, 3.6 ml d'une solution neutralisante (milieu de culture gelé) sont ajoutés sur les échantillons afin de récupérer les virus viables.

Le titrage des virus viables résiduels est alors aussitôt effectué.

V-5 Titrage viral

La technique utilisée est celle mentionnée dans la norme NF EN 14476 + A2 (Juillet 2019)

Des dilutions de raison 10 des suspensions virales sont réalisées dans le milieu de culture cellulaire.

Le titrage est effectué sur microplaques à 96 puits. Chaque dilution est transférée dans 8 puits.

V-6 Calcul du titre viral

L'effet cytopathique à partir de la suspension de récupération est déterminé après 4 jours de culture.

L'estimation du nombre d'unités infectieuses est déterminée par la méthode de SPAERMAN-KÄRBER en calculant le logarithme négatif du point limite 50% (lg DICT₅₀) par la formule suivante :

$Lg\ DICT_{50} = \text{Logarithme négatif de la plus haute concentration de virus utilisée} - [(Somme\ de\ \% \text{ affecté à chaque dilution}/100 - 0,5) \times (\lg\ de\ dilution)]$

Les essais suivants sont réalisés 3 fois

VI- RESULTATS**VI-1 Validation pour les essais 30 min et 1 heure****VI-1-1 Contrôle de la cytotoxicité**

Aucune cytotoxicité n'a été observée sur les cellules après mise en contact du milieu de culture sur les supports traités et sur les supports non traités.

VI-1-2 Contrôle de la sensibilité des cellules aux virus et arrêt de l'activité virucide

La différence entre la moyenne des titres (lg DICT₅₀) des témoins de la solution neutralisante et la moyenne des titres de sensibilité des surfaces traitées et non traitées doivent être inférieure ou égale à 0.5 lg.

Témoin solution neutralisante:

- Témoin 1 : lg DICT₅₀ = 3.63
- Témoin 2 : lg DICT₅₀ = 3.88
- Témoin 3 : lg DICT₅₀ = 3.75

Moyenne lg DICT₅₀ Témoin Sensibilité = 3.75

Témoin Sensibilité des surfaces non traitées

- Témoin 1 : lg DICT₅₀ = 3.88
- Témoin 2 : lg DICT₅₀ = 3.75
- Témoin 3 : lg DICT₅₀ = 3.75

Moyenne lg DICT₅₀ Témoin Sensibilité = 3.79

Moyenne titre solution neutralisante - Sensibilité des surfaces non traitées = 0.04

Différence ≤ 0.5 lg (vérification valide)

Essai Sensibilité et cytotoxicité de la surface traitée PROMAXSILVER-ACLIVSilver PET

- Témoin 1 : lg DICT₅₀ = 3.75
- Témoin 2 : lg DICT₅₀ = 3.75
- Témoin 3 : lg DICT₅₀ = 3.63

Moyenne lg DICT₅₀ Témoin Sensibilité = 3.71

Moyenne titre solution neutralisante - moyenne Sensibilité des surfaces traitées = 0.04

Difference ≤ 0.5 lg (vérification valide)

VI-1-3 Témoins TO

- Témoin 1 : lg DICT₅₀ = 5.88
- Témoin 2 : lg DICT₅₀ = 5.63
- Témoin 3 : lg DICT₅₀ = 5.50

Moyenne lg DICT₅₀ TO = 5.88

Titre viral maximum - Titre viral minimum = 0.07

Moyenne des 3 titres viraux

Les titres (lg DICT₅₀) des 3 essais à TO doivent être homogènes

Titre viral maximum - Titre viral minimum / Moyenne des 3 titres viraux ≤ 0,2.

Moyenne DICT₅₀ /ml = 4.68 10⁶

Moyenne DICT₅₀ /ml = 10^{Moyenne log₁₀ DICT₅₀} × 10

Titre d'infectivité (DICT₅₀/cm²) = $\frac{\text{DICT}_{50}/\text{ml} * \text{Volume de récupération (4ml)}}{\text{Surface (16 cm}^2\text{)}} = 1.17 10^6$

Le titre d'infectivité à TO (DICT₅₀/cm²) doit être compris entre 8.94 10⁵ et 4.46 10⁶

VI-2 Validation pour l'essai 24 heures

VI-2-1 Contrôle de la cytotoxicité

Aucune cytotoxicité n'a été observée sur les cellules après mise en contact du milieu de culture sur les supports traités et sur les supports non traités.

VI-2-2 Contrôle de la sensibilité des cellules aux virus et arrêt de l'activité virucide

La différence entre la moyenne des titres (lg DICT₅₀) des témoins de la solution neutralisante et la moyenne des titres de sensibilité des surfaces traitées et non traitées doivent être inférieure ou égale à 0.5 lg.

Témoin solution neutralisante:

- Témoin 1 : lg DICT₅₀ = 3.88
- Témoin 2 : lg DICT₅₀ = 4.00
- Témoin 3 : lg DICT₅₀ = 3.88

Moyenne lg DICT₅₀ Témoin Sensibilité = 3.92

Témoin Sensibilité des surfaces non traitées

- Témoin 1 : lg DICT₅₀ = 3.88
- Témoin 2 : lg DICT₅₀ = 3.75
- Témoin 3 : lg DICT₅₀ = 3.75

Moyenne lg DICT₅₀ Témoin Sensibilité = 3.79

Moyenne titre solution neutralisante - Sensibilité des surfaces non traitées = 0.13

Différence \leq 0.5 lg (vérification valide)

Essai Sensibilité et cytotoxicité de la surface traitée PROMAXSILVER-ACLIVSilver PET

- Témoin 1 : lg DICT₅₀ = 3.75
- Témoin 2 : lg DICT₅₀ = 3.63
- Témoin 3 : lg DICT₅₀ = 3.88

Moyenne lg DICT₅₀ Témoin Sensibilité = 3.75

Moyenne titre solution neutralisante - moyenne Sensibilité des surfaces traitées = 0.13

Différence \leq 0.5 lg (vérification valide)

VI-2-3 Témoins TO

- Témoin 1 : lg DICT₅₀ = 5.88
- Témoin 2 : lg DICT₅₀ = 6.00
- Témoin 3 : lg DICT₅₀ = 5.75

Moyenne lg DICT₅₀ TO = 5.88

Titre viral maximum - Titre viral minimum = 0.04
Moyenne des 3 titres viraux

Les titres (lg DICT₅₀) des 3 essais à TO doivent être homogènes

Titre viral maximum - Titre viral minimum / Moyenne des 3 titres viraux \leq 0,2.

$$\text{Moyenne DICT}_{50} / \text{ml} = 7.59 \cdot 10^6$$

$$\text{Moyenne DICT}_{50} / \text{ml} = 10^{\text{Moyenne log}_{10} \text{DICT}_{50}} \times 10$$

$$\text{Titre d'infectivité (DICT}_{50}/\text{cm}^2) = \frac{\text{DICT}_{50}/\text{ml} * \text{Volume de récupération (4ml)}}{\text{Surface (16 cm}^2)} = 1.89 \cdot 10^6$$

Le titre d'infectivité à T0 (DICT₅₀/cm²) doit être compris entre 8.94 10⁵ et 4.46 10⁶

VI-3 Essais

VI-3-1 30 minutes

Témoins T 30 minutes :

- Témoin 1 : lg DICT₅₀ = 5.50
- Témoin 2 : lg DICT₅₀ = 5.63
- Témoin 3 : lg DICT₅₀ = 5.38

$$\text{Moyenne lg DICT}_{50} \text{ T 30 min} = 5.50$$

$$\text{Moyenne DICT}_{50} / \text{ml} = 3.17 \cdot 10^6$$

$$\text{Moyenne DICT}_{50} / \text{ml} = 10^{\text{Moyenne log}_{10} \text{DICT}_{50}} \times 10$$

$$\text{Titre d'infectivité (DICT}_{50}/\text{cm}^2) =$$

$$\frac{\text{DICT}_{50}/\text{ml} * \text{Volume de récupération (4ml)}}{\text{Surface (16 cm}^2)} = 7.91 \cdot 10^5$$

Le titre d'infectivité au temps de contact 30 min (DICT₅₀/cm²) doit être supérieur à 2.21 10³

Essai 30 min

- Essai 1 : lg DICT₅₀ = 3.25
- Essai 2 : lg DICT₅₀ = 3.50
- Essai 3 : lg DICT₅₀ = 3.38

$$\text{Moyenne lg DICT}_{50} \text{ Essai} = 3.38$$

$$R = \text{Moyenne lg DICT}_{50} \text{ Témoin T 30 min} - \text{Moyenne lg DICT}_{50} \text{ Essai 30 min} = 2.12 \text{ log}$$

VI-3-1 1 heure

Témoins T 1 h :

- Témoin 1 : lg DICT₅₀ = 5.50
- Témoin 2 : lg DICT₅₀ = 5.63
- Témoin 3 : lg DICT₅₀ = 5.38

Moyenne lg DICT₅₀ T1 h = 5.50
Moyenne DICT₅₀ /ml = 3.17 10⁶

Moyenne DICT₅₀ /ml = 10^{Moyenne log₁₀ DICT₅₀} × 10

Titre d'infectivité (DICT₅₀/cm²) =

$$\frac{\text{DICT}_{50}/\text{ml} * \text{Volume de récupération (4ml)}}{\text{Surface (16 cm}^2\text{)}} = 7.91 \text{ } 10^5$$

Le titre d'infectivité au temps de contact 1 heure (DICT₅₀/cm²) doit être supérieur à 2.21 10³

Essai Surface 1 h

- Essai 1 : lg DICT₅₀ = 2.75
- Essai 2 : lg DICT₅₀ = 3.00
- Essai 3 : lg DICT₅₀ = 2.88

Moyenne lg DICT₅₀ Essai = 2.88

R = Moyenne lg DICT₅₀ Témoin T 1h - Moyenne lg DICT₅₀ Essai 30 min = 2.62 log

VI-3-3 24 heures

Témoins T 24 h :

- Essai 1 : lg DICT₅₀ = 5.50
- Essai 2 : lg DICT₅₀ = 5.63
- Essai 3 : lg DICT₅₀ = 5.63

Moyenne lg DICT₅₀ Essai = 5.59

Moyenne DICT₅₀ /ml = 3.89 10⁶

Moyenne DICT₅₀ /ml = 10^{Moyenne log₁₀ DICT₅₀} × 10

$$\frac{\text{Titre d'infectivité (DICT}_{50}/\text{cm}^2\text{)}}{\text{Surface (16 cm}^2\text{)}} = 9.73 \text{ } 10^5$$

Le titre d'infectivité au temps de contact 24 heures (DICT₅₀/cm²) doit être supérieur à 2.21 10³

Essai Surface 24h

- Essai 1 : lg DICT₅₀ = 2.13
- Essai 2 : lg DICT₅₀ = 2.00
- Essai 3 : lg DICT₅₀ = 2.25

Moyenne lg DICT₅₀ Essai = 2.13

R = Moyenne lg DICT₅₀ Témoin T 24h - Moyenne lg DICT₅₀ Essai 24h = 3.46 log

VII-CONCLUSION

Selon la méthodologie de la norme ISO 21702 (Mai 2019),

Le contact de la Surface PROMAXSILVER-ACLIVSilver PET avec la souche de coronavirus humain 229 E induit :

- Une réduction de la charge virale de 2.12 lg au temps de contact 30 min
- Une réduction de la charge virale de 2.62 lg au temps de contact 1 h
- Une réduction de la charge virale de 3.46 lg au temps de contact 24 h

Le traitement de la Surface PROMAXSILVER-ACLIVSilver PET induit une réduction de la charge virale de 99.24 % au temps de contact 30 min, de 99.76 % au temps de contact 1 heureset de 99.97 % au temps de contact 24 heures.