

R2004FER003-1

Détermination de l'activité virucide de la surface fonctionnalisée Top coat 51166 sur le coronavirus humain HCoV-229E selon un protocole adapté de la norme ISO21702

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

Approbateur/Validation Qualité

Nom : Moulès Vincent, Directeur General

Date : Lyon, le 13/05/2020

Signature :



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

Ce document comporte 8 pages

I. DOCUMENTS CONTRACTUELS

La présente prestation est définie par les documents suivants :

. Devis	2003FER002
. Commande	Bon pour accord en date du 31/03/2020

II. RÉSUMÉ DE L'ESSAI

Détermination de l'activité virucide de la surface fonctionnalisée Top coat 51166 sur le coronavirus humain HCoV-229E en présence des solutions interférentes ci-dessous :

-0.3 g/L BSA (condition de propreté standardisée domaine médical)

-mélange salive/mucus nasal (50%)

La surface non fonctionnalisée utilisée comme témoin est la surface dite « non traitée ».

III. STRATEGIE EXPERIMENTALE

III.I Surface fonctionnalisée : activité virucide

La stratégie expérimentale consiste à réaliser un dépôt de 50µl d'une solution, contenant $10^{E5}/10^{E6}$ virus (DICT₅₀) et les substances interférentes, sur les surfaces d'essai Top coat 51166 et la surface non traitée de 4 cm². Le volume de 50 µL est étalé sur une surface totale de 1 cm² et les surfaces d'essai sont incubées pendant 15 et 60 minutes sous Poste de Sécurité Microbiologique.

A l'issu des temps de contact, les surfaces sont immergées dans un volume de 2 mL de tampon de récupération (milieu EMEM, 2% SVF) et des refoulements sont réalisés avec une pro-pipette pour optimiser la récupération des virus.

Les analyses virologiques sont réalisées par détermination des titres infectieux sur cellules MRC5 (ATCC CCL-171) en dilution limite. Les lectures des effets cytopathogènes (ECP) sont réalisées après 6 jours d'incubation à 37°C et 5% CO₂.

III.II Conditions expérimentales

Date de l'essai : 13/04/2020

Surfaces d'essai :

Surface témoin : surface « non traitée »

Surface fonctionnalisée : Top coat 51166

Température : $20 \pm 1^\circ\text{C}$

Virus : coronavirus humain HCoV-229E (ATCC VR-740)

Temps de contact virus/surface : 15 et 60 minutes

IV. RESULTATS

A. Témoin de cytotoxicité

L'étape de récupération des virus est réalisée par trempage des surfaces dans le milieu de récupération. Il est nécessaire d'évaluer les potentiels effets cytotoxiques des tampons de récupération après trempage sur les cellules permissives MRC5.

Les cytotoxicités des surfaces sont déterminées par lecture visuelle des effets cytopathogènes (ECP) par microscopie et quantifiée par DICT_{50} sur les cellules permissives MRC5.

Dans les conditions de l'essai et en présence des substances interférentes, les surfaces d'essai Top coat 51166 et non traitée n'induisent pas d'effet cytopathogènes sur les cellules MRC5 ($< 0,5 \log \text{DICT}_{50}$, **Tableau 1**).

B. Témoin d'activité résiduelle

Il est nécessaire d'évaluer les potentielles activités virucides résiduelles des milieux de récupération après les étapes de trempage des surfaces d'essais.

Après les étapes de trempage des surfaces non inoculées avec des virus, les tampons de récupération sont dopés avec $1.8 \cdot 10^6 \text{DICT}_{50}$ de coronavirus HCoV-229E et les titres infectieux des solutions obtenues sont analysés en dilution limite sur cellules MRC5. Les titres infectieux des tampons de récupération des 2 surfaces et de la solution contrôle présentent une différence logarithmique inférieure à $0,5 \log \text{DICT}_{50}$ (Annexe, **Tableau 1**). Les composants chimiques des surfaces Top coat 51166 et non traitée n'induisent pas, dans les conditions des essais, d'activités virucides résiduelles sur le coronavirus HCoV-229E.

C. Témoin d'arrêt d'activité

Après inoculation des surfaces d'essai (virus et substances interférentes), les virus sont remis en solution à T0 via le trempage des surfaces dans le tampon de récupération. Les titres infectieux moyens obtenus à partir des tampons de récupération des surfaces Top coat 51166 et non traitée présentent une différence logarithmique inférieure à 0,5 log DICT₅₀ en présence des 2 solutions interférentes (**Tableau 1** et Annexe **Tableau 2**). Le protocole de remise en suspension des virus à partir des surfaces inoculées permet l'arrêt de l'activité virucide des surfaces d'essais.

D. Témoin de stabilité virale sur surface inox

Afin de contrôler la stabilité sur surface de la solution de dépôt contenant les virus et les solutions interférentes, des dépôts de 50 µl ont été réalisés sur disque inox 304L 2B de 20 mm de diamètre. Les disques inoculés ont été incubés à 20 ±1°C pendant 15 et 60 minutes sous Poste de Sécurité Microbiologique. L'analyse des titres infectieux obtenus montre une stabilité des coronavirus HCoV-229E sur surface inox en présence des conditions d'interférences sur une période de 60 minutes (Annexe, **Tableau 3**).

E. Activités virucides : essai

Surface	Condition d'interférence	Cytotoxicité (log ₁₀ DICT ₅₀)	Support	T0 (log ₁₀ DICT ₅₀)	T15 (log ₁₀ DICT ₅₀)	T60 (log ₁₀ DICT ₅₀)
surface non traitée	0,3 g/L BSA	0,5	S1	5,5	5,5	5,3
			S2	5,7	5,7	5,5
			S3	5,7	5,5	5,5
			<i>moyenne N1</i>	5,63	5,57	5,43
			<i>SD</i>	0,12	0,12	0,12
surface non traitée	Mucus/salive	0,5	S1	5,7	5,5	5,7
			S2	6	6	5,7
			S3	6	5,7	5,7
			<i>moyenne N1'</i>	5,90	5,73	5,70
			<i>SD</i>	0,17	0,25	0,00
Top coat 51166	0,3 g/L BSA	0,5	S1	6	3,5	3,3
			S2	6	3,5	2,5
			S3	5,7	3,7	2,5
			<i>moyenne N2</i>	5,90	3,57	2,77
			<i>SD</i>	0,17	0,12	0,46
			Abattement D1 (log DICT ₅₀)*	/	2	2,66
Top coat 51166	Mucus/salive	0,5	S1	6	4,5	3,3
			S2	6	4,5	3,5
			S3	6	4,3	3,5
			<i>moyenne N2'</i>	6	4,43	3,43
			<i>SD</i>	0	0,12	0,12
			Abattement D2 (log DICT ₅₀)*	/	1,3	2,27

Tableau 1 : abattements d'efficacité virucide de la surface Top coat 51166 sur le coronavirus humain HCoV-229E après 15 et 60 minutes de contact en présence des solutions interférentes 0,3 g/L BSA et mucus/salive.

N1: quantité moyenne en log₁₀ de virus (triplicata) surface « non traitée » (0,3 g/L BSA)

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

N2: quantité moyenne en log₁₀ de virus (triplicata) surface Top coat 51166 (0,3 g/L BSA)

N2': quantité moyenne en log₁₀ de virus (triplicata) surface Top coat 51166 (mucus/salive)

*D1 et D2 : abattements d'efficacité virucide pour chaque temps de contact (log₁₀)

$D1=N1-N2$ $D2=N1'-N2'$

V. CONCLUSION

La surface fonctionnalisée Top coat 51166 présente des efficacités virucides de 99,00% (2,00 log₁₀ DICT₅₀) et 99,78% (2,66 log₁₀ DICT₅₀) sur le coronavirus humain HCoV-229E respectivement après un temps de contact de 15 et 60 minutes en condition de propreté standardisée (domaine médical, 0,3 g/L BSA).

La surface fonctionnalisée Top coat 51166 présente des efficacités virucides de 94,99% (1,30 log₁₀ DICT₅₀) et 99,46% (2,27 log₁₀ DICT₅₀) sur le coronavirus humain HCoV-229E respectivement après un temps de contact de 15 et 60 minutes en présence de solution interférente salive/mucus.

VI. ANNEXES

I.1 Matériels et réactifs

- Lignée cellulaire

Nom: Cellules MRC5 ATCC CCL-171™

Nombre de passages : 12

Milieu de culture : EMEM (Lonza, lot n°0000734456,11/2019) complétementé avec du SVF 10% (Dutscher, lot n° S11971S1810), 1% d'antibiotiques (Lonza, lot n° 6MB152) et 1% de L-glutamine (Lonza, lot n° 6MB149)

- Souche virale

Nom : coronavirus Humain HCoV-229E (ATCC VR-740)

Suspension virale mère : 7.50×10^7 TCID₅₀/mL (Numéro du lot: 032020229-1)

Méthode de quantification :

- Réalisation des dilutions dans du milieu d'infection EMEM (Lonza, lot n°0000734463, 09/2019) complétementé avec du SVF 2% (Dutscher, lot n° S11971S1810), 1% d'antibiotiques (Lonza, lot n° 6MB152) et 1% de L-glutamine (Lonza, lot n° 6MB149)
- Dépôt de 100µL de chaque dilution dans 8 puits des 96 microplaques de culture cellulaire
- Incubation 6-7 jours à 37°C, 5% de CO₂

I.2 Préparation des réactifs

- 0.3g/L de BSA: Dissoudre 0.3g de BSA (SIGMA ALDRICH : lot n° SLB26632) dans 100 mL d'eau stérile, stérilisation par filtration sur membrane 0,2 µM.
- Mélanger 1mL de salive artificielle (ASTM 2721) avec 1mL de mucus d'épithélium nasaux (Epi 118, EPITHELIX)

I.3 Données brutes : Quantification en DICT₅₀/mL du coronavirus 229E

- Tableau 1 : Témoins d'arrêt d'activité

	Produit	Substance interférente	Temps de contact (min)	dilutions (-log)							TITRE particules virales/mL	TITRE LOG particules virales/mL	
				p	1	2	3	4	5	6			7
TO	surface E 6986	bsa	0	4	4	4	4	4	2	0	0	1,00E+06	6,0
			0	4	4	4	4	4	2	0	0	1,00E+06	6,0
			0	4	4	4	4	3	0	0	0	5,62E+05	5,7
	surface non-active		0	4	4	4	4	3	2	0	0	5,62E+05	5,7
			0	4	4	4	4	4	0	0	0	3,16E+05	5,5
			0	4	4	4	4	3	1	0	0	3,16E+05	5,5
	surface E 6986	mucus	0	4	4	4	4	4	2	0	0	1,00E+06	6,0
			0	4	4	4	4	4	2	0	0	1,00E+06	6,0
			0	4	4	4	4	4	2	0	0	1,00E+06	6,0
	surface non-active		0	4	4	4	4	3	2	0	0	5,62E+05	5,7
			0	4	4	4	4	4	2	0	0	1,00E+06	6,0
			0	4	4	4	4	4	2	0	0	1,00E+06	6,0

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 : Témoins d'activité résiduelle

	Produit	Substance interférente	Temps de contact (min)	dilutions (-log)							TITRE particules virales/mL	TITRE LOG particules virales/mL	
				p	1	2	3	4	5	6			7
activité résiduelle	surface E 6986	BSA	0	4	4	4	4	4	2	0	0	1,00E+06	6,0
			0	4	4	4	4	4	2	0	0	1,00E+06	6,0
			0	4	4	4	4	4	1	0	0	5,62E+05	5,7
	surface non-active		0	4	4	4	4	4	2	0	0	1,00E+06	6,0
			0	4	4	4	4	4	2	0	0	1,00E+06	6,0
			0	4	4	4	4	2	1	0	0	1,78E+05	5,3
	surface E 6986	mucus	0	4	4	4	4	3	1	0	0	3,16E+05	5,5
			0	4	4	4	4	3	1	0	0	3,16E+05	5,5
			0	4	4	4	4	4	2	0	0	1,00E+06	6,0
	surface non-active		0	4	4	4	4	4	1	0	0	5,62E+05	5,7
			0	4	4	4	4	4	0	0	0	3,16E+05	5,5
			0	4	4	4	4	3	2	0	0	5,62E+05	5,7

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 : Témoins de stabilité virale sur surface inox

	Produit	Substance interférente	Temps de contact (min)	dilutions (-log)							TITRE particules virales/mL	TITRE LOG particules virales/mL	
				p	1	2	3	4	5	6			7
Témoins stabilité	inox	bsa	0	4	4	4	4	4	2	0	0	1,00E+06	6,0
			0	4	4	4	4	4	1	0	0	5,62E+05	5,7
			0	4	4	4	4	4	0	0	0	3,16E+05	5,5
		mucus	0	4	4	4	4	3	2	0	0	5,62E+05	5,7
			0	4	4	4	4	4	1	0	0	5,62E+05	5,7
			0	4	4	4	4	4	2	0	0	1,00E+06	6,0

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 4 : essai

	Produit	Substance interférente	Temps de contact (min)	dilutions (-log)							
				p	1	2	3	4	5	6	7
Essais	surface E 6968	bsa	15	4	4	3	1	0	0	0	0
			15	4	4	4	1	0	0	0	0
			15	4	4	4	0	0	0	0	0
			60	4	4	3	0	0	0	0	0
			60	4	4	0	0	0	0	0	0
			60	4	4	0	0	0	0	0	0
	surface non-active		15	4	4	4	4	4	0	0	0
			15	4	4	4	4	3	2	0	0
			15	4	4	4	4	4	0	0	0
			60	4	4	4	4	3	1	0	0
			60	4	4	4	4	4	1	0	0
			60	4	4	4	4	4	2	0	0
	surface E 6969	mucus	15	4	4	4	4	0	0	0	0
			15	4	4	4	4	0	0	0	0
			15	4	4	4	3	0	0	0	0
			60	4	4	3	0	0	0	0	0
			60	4	4	4	0	0	0	0	0
			60	4	4	4	0	0	0	0	0
	surface non-active		15	4	4	4	4	3	0	0	0
			15	4	4	4	4	4	0	0	0
			15	4	4	4	4	4	0	0	0
			60	4	4	4	4	4	0	0	0
			60	4	4	4	4	3	2	0	0
			60	4	4	4	4	4	1	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