



Clarice Weis Arns (PhD, Professor)
Laboratório de virologia
Instituto de Biologia/Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP
CEP:13081-970 Campinas- SP- Brasil
FONE: (19) 3521-6258 Email: arns@unicamp.br



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de fevereiro de 2022.

Empresa Solicitante:

Peneirar Máquinas / CLOUDS

CNPJ 13329765/0001 11

Rua Santa Terezinha 12b, Bairro Darci Vargas

Contagem-MG

Cep: 32 372-170

A/C: Sr José de Fátima Mota

E-Mail: motadada@msn.com

Referente: laudo técnico ação virucida - EQUIPAMENTOS PURIFICADOR DE AR/CLOUDS

Vimos por meio desta enviar o relatório do ensaio eficácia a vírus realizado neste laboratório.

1. Introdução:

O presente estudo foi conduzido utilizando a metodologia descrita em "BS EN 14476:2013+A2:2019 Incorporating corrigendum August 2019: Chemical disinfectants and antiseptics -Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area - Test method and requirements (Phase 2/Step 1), com adaptações necessárias.

1.1. Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade virucida dos "EQUIPAMENTOS PURIFICADOR DE AR/CLOUDS em diferentes tempos de ação" frente ao vírus Coronavírus cepa MHV-3.

1.2. Instalação de Teste e Período de Condução do Estudo:

Os ensaios foram realizados em laboratório de Virologia, NB-2 (Biosafety Level 2), Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia Instituto de Biologia/UNICAMP, Campinas- SP- Brasil. As datas abaixo representam o período em que o estudo foi conduzido.

Data chegada ao laboratório:	27/01/2022
Início do Estudo	27/01/2022
Termino do Estudo	27/02/2022

Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de fevereiro de 2022.

2. Materiais e Métodos

Equipamentos analisados:

-Clouds Boxygen PC

Dentro da caixa do PC, o ar é movimentado por cooler
Contém 5 LEDs de 280 nm.

-Clouds Recycle Air UV

Dentro da caixa do PC, o ar é movimentado por cooler
Contém 1 lâmpada 3 W/280 nm.

-Clouds Oxigena

Dentro da caixa do PC, o ar é movimentado por cooler
Contém 5 LEDs de 280 nm.

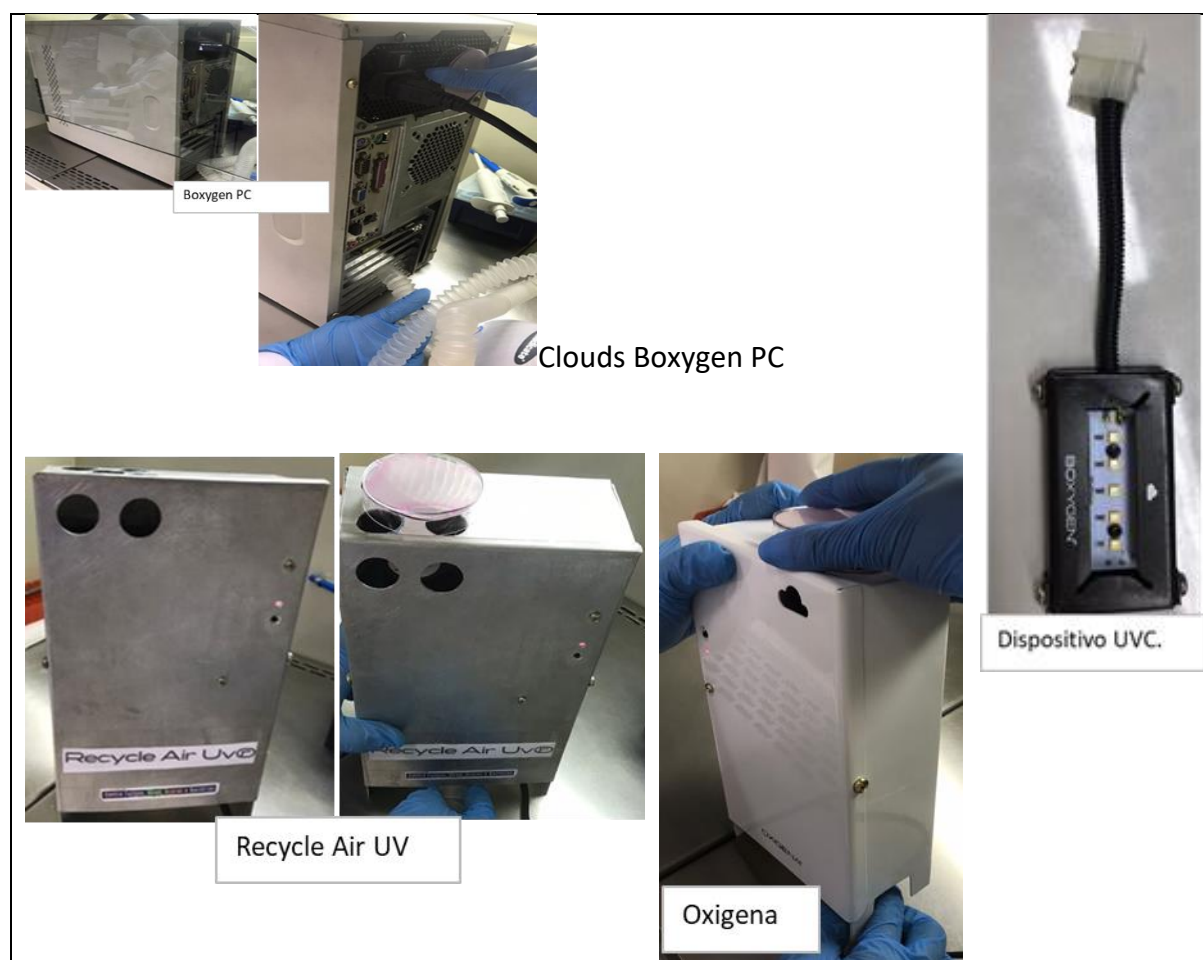


Figura 1: Três diferentes EQUIPAMENTOS PURIFICADOR DE AR/CLOUDS



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de fevereiro de 2022.

3. Condições experimentais

Temperatura do ensaio	22 °C +/- 1 °C
Concentração do produto	Equipamentos com de luz UVC
Controle de citotoxicidade	Teste <i>in vitro</i> na linhagem celular para a "Determinação da Dose Máxima Não Tóxica (DMTD)", para definir a concentração que não causa toxicidade às células.
Controle de neutralização	DMEM + 5% soro fetal bovino a 4 °C
Meio Cultivo Células	DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media)
Controle virucida	Formaldeído a 0,7%.
Temperatura de incubação	37 °C + 5% de atmosfera de CO ₂ .
Tempo de incubação	48h após período de adsorção do vírus a célula permissiva.
Controle de interferência	3 g/L albumina bovina + 1ml/L soro fetal bovino em água estéril desmineralizada

3.1. Vírus e Célula Utilizadas:

Vírus testados: Coronavírus cepa MHV-3 gênero *Betacoronavirus* (mesmo gênero e família das espécies SARS-CoV-1, SARS-CoV-2/Covid-19, MERS e outros).

Vírus e procedência	Linhagem Celular
Coronavírus MHV-3 Laboratório de Virologia, Instituto de Biologia – IB-Unicamp; GenBank (MW620427), Garcia, et al, 2021.	L-929: NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] (ATCC® CCL-1™)



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de fevereiro de 2022.

3.2. Multiplicação viral

As células foram cultivadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm² utilizando uma concentração inicial de 1.5×10⁵ células/mL em Meio Essencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) Gibco® livre de antibióticos e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para a propagação viral, as amostras foram inoculadas nas garrafas de cultivo celular e quando a monocamada apresentar 70% de efeito citopatogênico (CPE) irá proceder-se a raspagem da monocamada e agitação vigorosa até a dissolução dos grumos celulares.

Estoques de vírus portando 10^{5,0} doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICT₅₀) por 200µL foram estocadas a -80°C para uso posterior.

3.3. Titulação viral

Amostra de Coronavírus MHV-3 foi diluída em DMEM, titulada na base 10 (10¹ a 10¹⁰) e inoculada em quadruplicata em microplacas 96 orifícios de cultivo celular com volume de 100 µL/orifício. Em seguida foram adicionados 100 µL de célula na concentração de 1.5×10⁵ células/mL células/orifício às placas que foram incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂ por até quatro dias,

A leitura das placas foi feita em busca do efeito citopático (ECP) característico para cada vírus às respectivas células. O título viral foi definido em doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICT₅₀) e foi calculado pelo método de Spearman & Kaerber (Muthannan Andavar Ramakrishnan, 2016).

Fórmula Spearman & Kaerber:

$\log_{10} 50\% \text{ end point dilution} = - (x_0 - d/2 + d \sum r_i/n_i)$ <p>x_0 = log₁₀ of the reciprocal of the highest dilution (lowest concentration) at which all cells/CPE* are positive; d = log₁₀ of the dilution factor; n_i = number of cell used in each individual dilution (after discounting accidental deaths); r_i = number of positive CPE/cell (out of n_i).</p>

* CPE: Cytopathic effect (ECP: Efeito citopático provocado pelo vírus nas células)



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de fevereiro de 2022.

3.4. Determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT)

Para a determinação das concentrações/diluições a serem utilizadas nos testes virucidas foi necessário determinar a **concentração máxima que não causa toxicidade** para as células. Definir a concentração ideal para realizar a atividade antiviral/virucida, na diluição ideal para realizar o ensaio virucida.

As células foram cultivadas (3.2) em microplacas de 96 orifícios e após a sua aderência foi adicionado 100 µL substância teste diluída em água dura em diferentes diluições (10^1 a 10^{10}), incubadas por 48 horas e o resultado é lido através de microscópio invertido.

3.5. Cálculo e verificação da atividade virucida

A atividade virucida do produto de teste é avaliada calculando a diminuição do título em comparação com a titulação de controle sem o produto. A diferença é dada como fator de redução (FR). Onde: $FR = TV - TT$ (TV: Título de vírus do controle/não tratado e TT: Título de vírus do teste tratado).

De acordo com a EN 144476: 2019, uma solução antisséptica em uma concentração particular tem eficácia de inativação de vírus no título é reduzida em pelo menos quatro log₁₀ dentro do período de exposição recomendado. Isso corresponde a uma inativação de $\geq 99,99\%$.

3.6. Ensaio virucida:

- a) **Preparo das células:** Para os estudos virucidas foram distribuídas 100µL de célula (L929) nas microplacas de 96 orifícios com uma concentração de 1.5×10^5 células/mL células/orifício diluída em meio de cultura (DMEM) com 10% de Soro Fetal Bovino. As microplacas foram incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂ por 24 hs para que ocorra aderência das células às placas.
- b) Os EQUIPAMENTOS PURIFICADOR DE AR/CLOUDS foram testados numa câmara de biossegurança. Filtros estéreis com DMEM receberam ar e na saída foram adicionadas Placas de Petri contendo Coronavírus-MHV-3 (100 DICC/mL).



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de fevereiro de 2022.

As amostras com vírus em placa de Petri foram submetidas a diferentes tempos pré-determinados, 15 segundos e 1 minuto para "inativar" o vírus. Após cada tempo as placas foram recolhidas, lacradas e congeladas a -80°C até o momento do uso.

- c) A amostras com vírus foram testadas seguindo a metodologia recomendada:
- d.1) para a "Determinação da Concentração Máxima não tóxica (CMNT)" na célula testada, para determinar a concentração que não causa toxicidade para a célula. Pois a ação do UV-C deve ser ativa somente e contra o vírus e não às células.
- d.2) As placas foram submetidas a avaliação quanto a inibição ou não do vírus, a saber: Cada suspensão (Vírus + Diferentes amostras e diferentes tempos de contato) foi pipetada 100 µL em microplacas, homogeneizadas e diluídas.
- Em seguida 100 µL da célula (L929) foram pipetadas sobre a suspensão e incubadas a 37°C em Estufa com 5% de CO₂ durante 48 horas.
- d) Após transcorridos o período de incubação, as microplacas foram lidas através do Microscópio Ótico Invertido na busca do Efeito Citopático (ECP) característico do vírus (verifica-se a falta ou não do efeito citopático da infecção viral) e os títulos foram calculados com base no método de Spearman & Kaerber (3.3).
- Por fim, os resultados são expressos em percentual inativação viral (**Tabela 1**) em comparação com o controle viral (título do vírus) não tratado.

Resumo:

Controle Positivo: filtros estéreis com DMEM que recebeu ar com Vírus nos EQUIPAMENTOS PURIFICADOR DE AR/CLOUDS (diferentes tempos) + Cultivo de Células;
Controle Negativo: controle de células, apenas sistema celular, sem a presença de vírus e sem a presença de UVC e ou LEDS;
Controle do vírus: titulação Coronavírus (10^1 a 10^{10}) e cultivo celular.
Controle virucida: Formaldeído a 0,7% e linhagem celular em meio DMEM.
Controle Citotoxicidade: controle celular (2×10^5 células/mL) em meio DMEM, sem vírus e com amostras teste submetida a UVC e ou LEDS.



Clarice Weis Arns (PhD, Professor)
Laboratório de virologia
Instituto de Biologia/Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP
CEP:13081-970 Campinas- SP- Brasil
FONE: (19) 3521-6258 Email: arns@unicamp.br



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de fevereiro de 2022.

Tabela 1 - Os resultados são expressos em percentual de inativação viral em comparação com o controle viral não tratado:

Log de Redução	Fator de Redução	Percentual de Inativação/Redução
1	10	90%
2	100	99%
3	1000	99,9%
4	10.000	99,99%
5	100.000	99,999%
6	1.000,000	99,9999%

<https://microchemlab.com/information/log-and-percent-reductions-microbiology-and-antimicrobial-testing>



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de fevereiro de 2022.

3. Resultados:

Tabela 2- Resultado do Teste de citotoxicidade (Dose Máxima Não Tóxica-DMNT) dos EQUIPAMENTOS PURIFICADOR DE AR/CLOUDS, nas diluições de 10^1 a 10^{10} em DMEM testado em células e sem vírus (item 3.4).

Célula	O título da diluição mais alto que não mostra toxicidade as células hospedeiras
L-929: NCTC clone 929 (ATCC® CCL-1™)	Não apresentaram toxicidade frente a célula testada

Tabela 3 - Resultados *in vitro* da ação dos EQUIPAMENTOS PURIFICADOR DE AR/CLOUDS, testado por diferentes tempos de ação sobre Coronavírus (Cepa MHV-3).

Equipamento de descontaminação UVC	Tempos de exposição	Fator de Redução (FR) da Infectividade viral DICT50/ml ** log	Resultados em percentual Atividade (tabela 1) * Coronavírus-MHV
Clouds Boxygen	15 segundos	1	90% de inativação do vírus
	1 minuto	2	99% de inativação do vírus
Clouds Recycle Air UV-C	15 segundos	3	99,9% de inativação do vírus
	1 minuto	3	99,9% de inativação do vírus
Clouds Oxigena	15 segundos	3	99,9% de inativação do vírus
	1 minuto	3	99,9% de inativação do vírus
Título do Coronavírus Cepa MHV-3 sem produto:			$10^{8,25}$ DICT50/ml

** Onde: FR= TV-TT (TV: Título de vírus não tratado - TT: Título de vírus do teste tratado) calculado em DICT50/ml, Média de diluições do vírus (de 10^1 a 10^{10}) em 04 repetições (item 3.5).



Clarice Weis Arns (PhD, Professor)
Laboratório de virologia
Instituto de Biologia/Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP
CEP:13081-970 Campinas- SP- Brasil
FONE: (19) 3521-6258 Email: arns@unicamp.br



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de fevereiro de 2022.

4. Conclusões:

- Os equipamentos **Clouds Recycle Air UV-C e Clouds Oxigena** mostraram uma inativação viral de 99,9% e o equipamento Clouds Boxygen 90% a 99%;
- Considerando que houve inativação de até 99,9%, pode-se concluir que os **equipamentos Clouds Recycle Air UV-C e Clouds Oxigena** foram eficazes para a inativação do grupo Coronavírus.
- As amostras submetidas a UV-C testadas *in vitro* não foram tóxicas frente a linhagem de célula testada.

Prof. Dr. Clarice Weis-Arns (Responsável pelo Laudo)



Clarice Weis Arns (PhD, Professor)
Laboratório de virologia
Instituto de Biologia/Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP
CEP:13081-970 Campinas- SP- Brasil
FONE: (19) 3521-6258 Email: arns@unicamp.br



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de fevereiro de 2022.

Bibliografia Consultada:

BS EN 14476:2013+A2:2019

Incorporating corrigendum August 2019

Chemical disinfectants and antiseptics -Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area - Test method and requirements (Phase 2/Step 1)

Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.

Arch Exp Path Pharmac; 162, 1931, 480-487.

Spearman, C.: The method of 'right or wrong cases' (constant stimuli) without Gauss's formulae. Brit J Psychol; 2 1908, 227-242

G. Kampf D., Todt, S. Pfaender, E. Steinmann

Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents

Journal of Hospital Infection 104 (2020) 246e251

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022> 0195-6701

Garcia AB, de Moraes AP, Rodrigues DM, Gilioli R, de Oliveira-Filho EF, Durães-Carvalho R, et al.

Coding-Complete Genome Sequence of Murine Hepatitis Virus Strain 3 from Brazil. Microbiology Resource Announcements. 2021;10: e00248-21

Muthannan Andavar Ramakrishnan

Determination of 50% endpoint titer using a simple formula

World J Virol

May 12;5(2):85-6. doi: 10.5501/wjv.v5.i2.85. (2016)



Cidade Universitária "ZEFERINO VAZ", 27 de fevereiro de 2022.

Anexos:

Aparelhos utilizados:

- Cabines de biossegurança nível II e III
- Geladeiras
- Biofreezer - 80 °C
- Biofreezer -150 °C
- Incubadoras de CO₂
- Agitador (misturador Vortex)
- Medidor de pH
- Microscópio Invertido (Olympus, tipo CK 30)
- Centrífuga 5804 R (Eppendorf AG)
- Banho-maria
- Medidor pH

vidrarias e pequenos itens de produto

- Pipetas descartáveis, ajustáveis e de volume fixo (Eppendorf AG)
- Microplacas de 96 poços Polysterol (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Frasco de cultura celular
- Tubos de ensaio selados
- Pipetas mono e multicanais (Eppendorf)
- Filtros descartáveis

Meio de cultura e reagentes

- Solução de antibióticos (penicilina-estreptomicina).
- Estoque de vírus conservado em -80°C
- Soro fetal de Bovino
- Solução de formaldeído 1,4%
- Aqua bidest. (Sistema de água ultrapura Sartorius)
- PBS (Invitrogen, artigo nº 18912-014)
- BSA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, artigo no. CA-2153)
- Eritrócitos de ovelha.
- Albumina
- Solução de tripsina versene 0,25%
- DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media): DMEM 9,6 g, Trishidroximetilaminometano (Tris) 2,4% 50 mL, Bicarbonato de sódio 2,0 g, H₂O ultrapura q.s.p. 1000 mL.
- Meio de congelamento de células;
- DMSO- Dimetilsulfóxido-10% e Soro fetal bovino 90%)